



Multirésistance des entérobactéries aux antibiotiques et modulation de l'influx et de l'efflux membranaires chez *Escherichia coli* ST131

Alix Pantel

► To cite this version:

Alix Pantel. Multirésistance des entérobactéries aux antibiotiques et modulation de l'influx et de l'efflux membranaires chez *Escherichia coli* ST131. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2015. Français. NNT : 2015MONTT038 . tel-01346531

HAL Id: tel-01346531

<https://theses.hal.science/tel-01346531>

Submitted on 19 Jul 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

DE L'UNIVERSITE DE MONTPELLIER

**Préparée au sein de l'Ecole Doctorale 168 :
Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2)
et de l'Unité de Recherche INSERM 1047**

Spécialité : Microbiologie

Présentée par Alix PANTEL

**Multirésistance des entérobactéries aux antibiotiques,
Modulation de l'influx et de l'efflux membranaires chez
Escherichia coli ST131**



Soutenue le 9 décembre 2015 devant le jury composé de :

Monsieur le Dr Jean-Marie PAGES

Madame le Pr Marie-Hélène NICOLAS-CHANOINE

Madame le Dr Anne DAVIN-REGLI

Monsieur le Pr Albert SOTTO

Monsieur le Pr Jean-Philippe LAVIGNE

Président, Rapporteur

Rapporteur

Membre du jury

Directeur

Co-directeur

A Baptiste, Gaspard et Joseph,
A mon frère et mes parents,
A mes amis.

REMERCIEMENTS

A Madame le Docteur Anne DAVIN-REGLI,
pour me faire l'honneur de présider ce jury de thèse.

A Madame le Professeur Marie-Hélène NICOLAS-CHANOINE et Monsieur le Docteur Jean-Marie PAGES,
pour avoir accepté de juger ce travail et en être les rapporteurs. Merci pour vos précieux conseils et votre disponibilité tout au long de ce travail.

A Messieurs les Professeurs Albert SOTTO et Jean-Philippe LAVIGNE,
pour m'avoir confié ce travail passionnant et m'avoir accordé leur confiance. Merci pour votre disponibilité et vos encouragements durant ces quatre années. C'est pour moi un grand plaisir de travailler avec vous.

A Monsieur le Docteur David O'CALLAGHAN,
pour m'avoir accueillie au sein de son Unité de Recherche, pour ses conseils et ses talents de pâtissier.

A toute l'équipe de l'U1047 de la Faculté de Médecine de Nîmes,
en particulier Catherine pour son soutien, Anne et Annette pour leurs fructueux conseils, Christelle pour son sourire infaillible, Jennifer pour sa patience et son aide dans la manipulation de Prism, Fatiha, Jérémy et les Christine pour leur aide et leur gentillesse. Merci également à tous les doctorants étrangers, Paula, Amel, Soumia, Rachida et Amir, qui ont ponctué ces années de belles rencontres.

A tous les membres du Laboratoire de Microbiologie du CHU de Nîmes,
pour leur accueil chaleureux durant mon internat et mon assistanat. Un grand merci aux techniciens pour leur bonne humeur, à Sylvie, Cécilia et Nicole pour leurs encouragements et pour m'avoir permis de me noter souvent en « fac », à Marie-Jo pour son aide précieuse dans les analyses de séquences, à Milène, Laurence, Annick et enfin aux internes, en particulier Charlotte, Mathilde, Alexandre, Dimitri et Ismaël, qui ont largement contribué à l'avancement des travaux épidémiologiques.

C'est un réel bonheur de travailler avec vous tous.

RESUME

La diffusion des entérobactéries multirésistantes aux antibiotiques (MDR) à l'échelle mondiale constitue une menace de santé publique majeure. Résistantes à au moins trois classes d'antibiotiques, les entérobactéries MDR entraînent des infections échappant aux traitements de première intention. La première partie de ce travail s'intéresse à l'épidémiologie moléculaire des souches d'entérobactéries MDR isolées dans les infections et les colonisations des patients hospitalisés en Languedoc-Roussillon, en France, et dans un pays où cette épidémiologie est encore peu connue, l'Algérie. Nous avons montré, dans notre région et au niveau national, que la résistance aux carbapénèmes était essentiellement liée à des modifications de la perméabilité membranaire (87,4% des entérobactéries résistantes, au niveau national).

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons étudié les modulations de la perméabilité membranaire et de l'efflux chez *Escherichia coli* ST131, l'exemple-type d'un clone MDR. Nous avons montré que ce clone mondial présentait une remarquable adaptabilité à la pression antibiotique. Cette adaptabilité avait un impact significatif sur la virulence et le fitness de *E. coli*. Les capacités de formation de biofilm et la virulence chez *Caenorhabditis elegans* étaient augmentées chez les souches de phénotypes « efflux ». Inversement, les souches de phénotypes « imperméabilité » présentaient un faible potentiel de virulence, associé à une diminution significative de la formation de biofilm et de la mobilité par swimming.

Mots-clés : Multirésistance aux antibiotiques, Entérobactéries, Carbapénémases, *Escherichia coli*, ST131, Virulence, Perméabilité membranaire, Pompes d'efflux, Biofilm, Mobilité.

SUMMARY

The spread of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* (MDR) is a major public health threat worldwide. Resistant to at least three classes of antibiotics, MDR *Enterobacteriaceae* cause infections for which first-line treatments are inefficient. The first part of this work focused on the molecular epidemiology of MDR *Enterobacteriaceae* strains isolated in infections and colonizations of patients hospitalized in Languedoc-Roussillon, in France and in Algeria, a country where few data are currently available. We showed in our region and nationally, that resistance to carbapenems was mainly due to changes in membrane permeability (87.4% of resistant *Enterobacteriaceae*, nationally).

In the second part of this work, we studied the modulation of membrane efflux and permeability in the quintessential example of an international MDR high-risk clone, *Escherichia coli* ST131. We showed that this global clone had a remarkable adaptability to antibiotic pressure. This adaptability had a significant impact on the virulence and the fitness of *E. coli*. The biofilm formation and virulence capacities in *Caenorhabditis elegans* model were increased in strains overexpressing an efflux system. Conversely, the strains with altered porins expression had a low potential virulence, associated with a significant reduction in biofilm formation and swimming motility.

Keywords: Multidrug-Resistance, *Enterobacteriaceae*, Carbapenemases, *Escherichia coli*, ST131, Virulence, Membrane permeability, Efflux pumps, Biofilm, Motility.

ABBREVIATIONS

AAC	« Aminoglycoside N-ACetyltransferase »
ABC	« ATP Binding Cassette »
acr	Acriflavine
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ANT	« Aminoglycoside O-NucleotidylTransferase »
APH	« Aminoglycoside O-PHosphotransferase »
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
BLSE	β-Lactamase à Spectre Etendu
BMR	Bactérie MultiRésistante
BHRe	Bactérie Hautement Résistante émergente
C3G	Céphalosporine de 3 ^{ème} Génération
CHDL	« Carbapenem-Hydrolyzing class D β-Lactamase »
CHT	« <i>fumC</i> <i>fimH</i> typing »
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CMP	Chloramphénicol
CMY	« β-Lactamase active on CephaMYcins »
CTX-M	CéfoTaXimase-Munich
DHA	« Dhahran Hospital »
DHFR	DiHydroFolate Réductase
DHPS	DiHydroPtéroate Synthétase
EAEC	« EnteroAggregative <i>E. coli</i> » (<i>E. coli</i> entéroagréatif)
EARS-Net	« European Antimicrobial Resistance Surveillance network »
EBLSE	Entérobactérie productrice de β-Lactamase à Spectre Etendu
ECDC	« European Centre for Disease Prevention and Control »
EHEC	« EnteroHaemorrhagic <i>E. coli</i> » (<i>E. coli</i> entérohémostatique)
EIEC	« EnteroInvasive <i>E. coli</i> » (<i>E. coli</i> entéroinvasif)
EPC	Entérobactérie Productrice de Carbapénémase
EPEC	« EnteroPathogenic <i>E. coli</i> » (<i>E. coli</i> entéropathogène)
ETEC	« EnteroToxigenic <i>E. coli</i> » (<i>E. coli</i> entérotoxigénique)
ETP	Ertapénème
ExPEC	« Extraintestinal Pathogenic <i>E. coli</i> » (<i>E. coli</i> pathogènes extra-intestinaux)
<i>fimH</i>_{TR}	« <i>fimH</i> Typing Region »
FOX	Céfoxitine
GES	« Guyana Extended-Spectrum β-lactamase »
IBC	« Intracellular Bacterial Community » (Communauté bactérienne intracellulaire)

IMP	IMiPénémase
InVS	Institut national de Veille Sanitaire
IS	« Insertion Sequence » (Séquence d'insertion)
KPC	« <i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenamase »
LB	Milieu Luria Bertani
MALDI-TOF	« Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry »
mar	« multiple antibiotic resistance »
MATE	« Multidrug and Toxic Compound Extrusion »
MBL	Métallo- β -Lactamase
MDR	« Multi-Drug Resistance » (Multirésistance aux antibiotiques)
MFS	« Major Facilitator Superfamily »
MH	Milieu Mueller Hinton
MLST	« Multi-Locus Sequence Typing »
MNEC	« Meningitis Associated <i>E. coli</i> » (<i>E. coli</i> associé à des méningites)
NDM	« New Delhi Metallo- β -lactamase »
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ONERBA	Observatoire national de l'épidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques
OXA	OXAacillinase
PAβN	Phénylalanine Arginine- β -Naphthylamide
PAI	« PAtHogenicity Island » (Ilot de pathogénicité)
PAP	« Pyelonephritis-Associated <i>Pili</i> » <i>Pili</i> associé à une pyélonéphrite
PER	« <i>Pseudomonas</i> Extended Resistance »
PLP	Protéines de Liaison aux Pénicillines
pb	paire de bases
PCR	« Polymerase Chain Reaction »
PFGE	« Pulsed Field Gel Electrophoresis » (Electrophorèse en champ pulsé)
PMQR	« Plasmid-Mediated Quinolones Resistance »
QIR	« Quiescent Intracellular Reservoir » (Réservoir intracellulaire quiescent)
QRDR	« Quinolone Resistance-Determining Region »
RND	« Resistance Nodulation Division »
SHV	« SulfHydryl reagent Variable »
SMR	« Staphylococcal Multiresistance »
SNP	« Single Nucleotide Polymorphism »
sox	« superoxide stress response »
ST	« Sequence Type » (Séquençotype)
TEM	Temoneira
UPEC	« UroPathogenic <i>E. coli</i> » <i>E. coli</i> uropathogène
VEB	« Vietnam Extended-spectrum β -lactamase »
VIM	« Verona Integron-encoded Metallo- β -lactamase »

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS	5
LISTE DES TABLEAUX	11
LISTE DES FIGURES.....	11
INTRODUCTION	13
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	16
1 Multirésistance des entérobactéries aux antibiotiques	17
1.1 Définition	17
1.2 Résistance par inactivation enzymatique de l'antibiotique	17
1.2.1 Résistance aux β -lactamines	17
1.2.1.1 Classification des β -lactamases	18
1.2.1.2 Les β -lactamases à spectre étendu (BLSE)	21
1.2.1.3 Les céphalosporinases plasmidiques.....	26
1.2.1.4 Les carbapénémases.....	27
1.2.2 Résistance aux aminosides	34
1.2.3 Résistance au chloramphénicol	36
1.3 Résistance par modification de la cible de l'antibiotique.....	36
1.3.1 Résistance aux quinolones	36
1.3.2 Résistance à la tétracycline et aux aminosides.....	37
1.3.3 Résistance aux sulfamides et au triméthoprimé	38
1.4 Résistance par défaut d'accumulation de l'antibiotique	38
2 <i>Escherichia coli</i>	39
2.1 Taxonomie	39
2.2 Caractères bactériologiques	39
2.3 Habitat	40
2.4 Pathogénicité et plasticité du génome	40
2.4.1 Les <i>Escherichia coli</i> pathogènes intestinaux	41
2.4.2 Les <i>Escherichia coli</i> pathogènes extra-intestinaux	42
2.4.2.1 UPEC	42
2.4.2.2 MNEC.....	47
2.4.3 Plasticité du génome.....	47
2.5 Typage des <i>Escherichia coli</i>	49

2.5.1	Sérogroupage et sérotypage.....	49
2.5.2	Electrophorèse en champ pulsé.....	49
2.5.3	Phylotyping.....	50
2.5.4	Multi-Locus Sequence Typing (MLST).....	50
2.5.5	Typage de l'allèle <i>fimH</i>	52
2.5.6	Séquençage génomique	52
3	<i>Escherichia coli</i> ST131	53
3.1	Caractères bactériologiques.....	53
3.1.1	Phylotype et sérotypes.....	53
3.1.2	Facteurs de virulence et virotypes	53
3.1.3	Typage des sous-clones de <i>E. coli</i> ST131	54
3.1.3.1	Pasteur Sequence Types (PSTs).....	54
3.1.3.2	Pulsotypes	55
3.1.3.3	<i>fimH</i> type.....	55
3.1.4	Méthodes de screening des <i>E. coli</i> ST131	57
3.1.4.1	Méthodes basées sur l'analyse de SNPs spécifiques.....	57
3.1.4.2	Spectrométrie de masse	57
3.2	Epidémiologie des <i>E. coli</i> ST131	58
3.2.1	Dissémination mondiale.....	58
3.2.2	Prévalence parmi les isolats cliniques humains	59
3.2.2.1	Prévalence parmi les <i>E. coli</i> producteurs de BLSE.....	59
3.2.2.2	Prévalence parmi tous les <i>E. coli</i>	60
3.2.3	Prévalence parmi les isolats de la flore commensale humaine	60
3.2.4	Présence chez l'animal.....	61
3.2.4.1	Animaux de compagnie	61
3.2.4.2	Animaux d'élevage	61
3.2.4.3	Animaux sauvages	62
3.2.5	Réservoir environnemental	62
3.3	Pathogénicité	63
3.3.1	Types d'infections engendrées et sévérité.....	63
3.3.2	Eléments pouvant expliquer le succès	63
3.3.2.1	Capacité de transmission	63
3.3.2.2	Potentiel de colonisation et d'adhésion.....	64
3.3.2.3	Potentiel métabolique	65
3.3.2.4	Production de biofilm	65
3.3.3	Virulence chez le modèle animal.....	66
3.4	Résistance des <i>E. coli</i> ST131 aux antibiotiques.....	67
3.4.1	Généralités	67
3.4.2	Résistance acquise aux β -lactamines	68
3.4.2.1	Production de BLSE	68
3.4.2.2	Production de carbapénémases	68
3.4.2.3	Autres enzymes.....	69
3.4.3	Résistance acquise aux quinolones.....	69

3.4.4	Résistance aux aminosides	70
3.4.5	Résistance aux autres antibiotiques	70
4	Modulation de l'influx et de l'efflux membranaires chez <i>E. coli</i>	71
4.1	Imperméabilité membranaire	71
4.1.1	Structure et fonction des porines	72
4.1.2	Régulation de la perméabilité membranaire	74
4.1.2.1	Régulation transcriptionnelle	74
4.1.2.2	Régulation post-transcriptionnelle	75
4.1.2.3	Régulation post-traductionnelle	76
4.1.2.4	Régulation globale par les composants de la famille AraC/XylS	76
4.1.3	Rôle des porines dans la résistance aux antibiotiques	78
4.1.3.1	Diminution de l'expression des porines	79
4.1.3.2	Mutation des porines	80
4.1.3.3	Inhibition des porines	80
4.1.4	Impact de l'imperméabilité sur la virulence	81
4.2	Efflux membranaire	81
4.2.1	La pompe AcrAB-TolC	83
4.2.1.1	Structure	83
4.2.1.2	Substrats	85
4.2.1.3	Régulation	85
4.2.1.4	Impact sur la résistance aux antibiotiques	86
4.2.2	Les autres pompes	88
4.2.3	Inhibiteurs des pompes à efflux	88
4.2.4	Rôle de l'efflux dans la virulence	89
	TRAVAUX ORIGINAUX	90
1	Epidémiologie de la multirésistance aux antibiotiques chez les entérobactéries	91
Publication n°1	97
Publication n°2	104
Publication n°3	113
Publication n°4	120
Publication n°5	128
Publication n°6	132
Publication n°7	139
Publication n°8	156
Publication n°9	162
Publication n°10	166
2	Etude des modulations de la perméabilité membranaire et de l'efflux chez <i>E. coli</i> ST131, impact sur le fitness et la virulence	171
Publication n°11	172
	DISCUSSION - PERSPECTIVES	209
1	Multirésistance aux antibiotiques chez les entérobactéries	210

2	Modulation de l'influx et de l'efflux membranaires chez <i>E. coli</i> ST131	212
	CONCLUSION.....	218
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	219

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Classification des β -lactamases selon Bush et Ambler	20
Tableau 2. Principaux facteurs de virulence identifiés chez les ExPEC	43
Tableau 3. Virotypes de <i>E. coli</i> ST131 selon l'expression de 11 gènes de virulence.....	54

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Substitutions en acides aminés décrites chez les BLSE de type TEM	22
Figure 2. Substitutions en acides aminés décrites chez les BLSE de type SHV	22
Figure 3. Dendrogramme des enzymes de type CTX-M.....	24
Figure 4. Répartition mondiale des différentes BLSE de type CTX-M.....	25
Figure 5. Evolution de la proportion des souches de <i>E. coli</i> résistantes aux céphalosporines de 3 ^{ème} génération isolées dans les prélèvements invasifs (hémoculture, liquide céphalo-rachidien) entre 2002 et 2013	25
Figure 6. Nombre d'épisodes impliquant des entérobactéries productrices de carbapénémases en France signalés à l'InVS entre 2004 et 2015, selon la mise en évidence ou non d'un lien avec un pays étranger : bilan du 4 Mars 2015 (N=1625)	29
Figure 7. Distribution géographique des isolats producteurs de carbapénémases KPC.....	30
Figure 8. Distribution géographique des isolats producteurs de carbapénémases NDM.....	31
Figure 9. Distribution géographique mondiale (A) et européenne (B) des EPC de type VIM et IMP	33
Figure 10. Distribution géographique des isolats producteurs de carbapénémases OXA-48 .	34
Figure 11. Proportion de souches de <i>K. pneumoniae</i> (A) et <i>E. coli</i> (B) résistantes aux aminosides isolées dans les infections invasives en 2013 en Europe.....	35
Figure 12. Proportion de souches de <i>K. pneumoniae</i> (A) et <i>E. coli</i> (B) résistantes aux fluoroquinolones isolées dans les infections invasives en 2013 en Europe	37
Figure 13. Sites d'infection des différents pathovars de <i>E. coli</i>	41
Figure 14. Facteurs de virulences impliqués dans la pathogénicité des UPEC aux niveaux vésical (A) et rénal (B)	45

Figure 15. Représentation schématique de la structure des <i>pili</i> de type 1 (A) et des <i>pili</i> de type P (B) chez les UPEC	46
Figure 16. Communauté intracellulaire bactérienne (IBC) au cours d'une cystite aigue	46
Figure 17. Représentation schématique du cycle de vie intracellulaire des UPEC.....	47
Figure 18. Evolution du core génome (A) et du pangénome (B) de <i>E. coli</i> en fonction du nombre de génomes séquencés disponibles	48
Figure 19. Transferts horizontaux de matériel génétique chez <i>E. coli</i>	49
Figure 20. Fond phylogénétique des ExPEC, InPEC et des <i>E. coli</i> non pathogènes d'après les données MLST du système d'Achtman (logiciel Seqsphere, Ridom GmbH)	51
Figure 21. Correspondance entre les STs et les CHTs pour les 5 plus grands complexes clonaux de <i>E. coli</i>	52
Figure 22. Analyse phylogénomique de l'émergence de la résistance aux fluoroquinolones et de la production de BLSE CTX-M-15 au sein du clone ST131.....	56
Figure 23. Dissémination mondiale des <i>E. coli</i> ST131	58
Figure 24. Evolution du pourcentage de <i>E. coli</i> producteurs de BLSE et de <i>E. coli</i> ST131 parmi les <i>E. coli</i> isolées dans les bactériémies entre 2000 et 2011 à Calgary (Canada).....	60
Figure 25. Embryon de poisson zèbre 24 heures suivant la micro-injection de la souche MECB5 (<i>E. coli</i> ST131 de virotype C)	65
Figure 26. Enveloppe de <i>E. coli</i> et voie de passage des antibiotiques	71
Figure 27. Structure de la porine OmpF de <i>E. coli</i>	73
Figure 28. Liaison entre les systèmes de régulation CpxA/CpxR et EnvZ/OmpR médiée par MzcA	75
Figure 29. Cascade de régulation de la perméabilité membranaire proposée chez <i>E. coli</i>	78
Figure 30. Les 5 grandes familles de pompes d'efflux	82
Figure 31. Modèle de structure proposé pour la pompe d'efflux AcrAB-TolC.....	84
Figure 32. Evolution du nombre de souches d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes (n=724) et productrices de carbapénémases (n=157) reçues, par mois, au Laboratoire de Microbiologie du CHU de Nîmes, depuis Février 2011	93
Figure 33. Dendrogramme basé sur l'analyse par rep-PCR (diversiLab®, bioMérieux) des souches de <i>K. pneumoniae</i> productrices de NDM (\pm OXA-48) adressées au Laboratoire de Microbiologie du CHU de Nîmes (2014-2015)	94

INTRODUCTION

Depuis le début des années 2000, l'incidence globale des entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (EBLSE) a augmenté dans de nombreux pays, au point que l'on parle désormais de pandémie d'EBLSE (1). Cette situation constitue un problème de santé publique car ces bactéries, non seulement résistantes à la plupart des β -lactamines, présentent souvent des résistances associées à d'autres classes d'antibiotiques utilisées en thérapeutique humaine, en particulier les fluoroquinolones, les aminosides et l'association sulfaméthoxazole-triméthoprine (2).

Au cours de la dernière décennie, les souches d'Entérobactéries Productrices de Carbapénémase (EPC) ont également émergé et sont devenues endémiques dans certaines régions du globe (3, 4). Les carbapénèmes comptant parmi les rares molécules encore actives en cas d'infections à EBLSE (5), la diffusion de souches capables de les hydrolyser est particulièrement préoccupante, car elle conduit à des situations d'échecs thérapeutiques (4, 6). Le premier objectif de ce travail sera d'étudier l'épidémiologie moléculaire de la multirésistance aux antibiotiques (MDR) des souches d'entérobactéries isolées dans les infections et les colonisations des patients hospitalisés en Languedoc-Roussillon, en France, et dans un pays où cette épidémiologie est peu connue, l'Algérie. Les animaux destinés à la consommation humaine constituant un réservoir potentiel de résistance aux antibiotiques, nous nous intéresserons également à la prévalence de la MDR chez la volaille, en Algérie.

Au sein des entérobactéries, *Escherichia coli* est devenu progressivement l'espèce la plus concernée par l'émergence des « nouvelles » BLSE: les CTX-M (1, 7). Les *E. coli* uropathogènes (UPEC) sont la principale étiologie des infections du tractus urinaire, à la fois en milieux communautaire et hospitalier (8). En raison de l'abondance et du caractère ubiquitaire de *E. coli*, de la fréquence des infections communautaires et associées aux soins dans lesquelles cette espèce est impliquée, la diffusion des CTX-M chez *E. coli* inquiète grandement la communauté scientifique et médicale (9, 10).

En 2008, un clone de séquençotype 131 a été identifié sur 3 continents (11). Il a été montré, en 2010, que ce clone était à l'origine de la majorité des infections à *E. coli* multirésistants (MDR) (12). Au sein des *E. coli* ST131, un sous-clone majeur a rapidement diffusé. Ce sous-clone, dénommé H30-Rx, se distingue par l'expression de l'allèle 30 de *fimH* (codant pour l'adhésine des *fimbriae* de type 1), la production de l'enzyme CTX-M-15 et la résistance aux fluoroquinolones par des mutations spécifiques de *gyrA* et *parC* (13).

En plus des mécanismes d'hydrolyse enzymatique et de modification de cibles, la variation de l'influx et de l'efflux membranaires est un paramètre-clé de la résistance bactérienne aux

antibiotiques. Chez les entérobactéries, les systèmes d'efflux de type RND (« Resistance Nodulation Division ») jouent un rôle prépondérant dans la multirésistance. La surexpression de la pompe AcrAB-TolC entraîne chez les entérobactéries une résistance croisée aux β -lactamines (notamment les molécules les plus lipophiles), aux quinolones, aux cyclines et au chloramphénicol (14). L'imperméabilité membranaire par défaut d'expression des porines (OmpC et OmpF chez *E. coli*) est associée à une diminution de sensibilité des β -lactamines (15). Les molécules les plus touchées sont les carbapénèmes, c'est-à-dire le traitement de choix des infections sévères à bacilles à Gram négatif multirésistants (5), et les céphamycines, une possible alternative dans le traitement des infections causées par EBLSE (16, 17).

Si l'impact de la modulation de la perméabilité membranaire sur la virulence a été étudiée chez *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* ou *Salmonella enterica* (18–20), peu d'études se sont intéressées à cet impact chez *E. coli*, et aucune chez le clone pandémique ST131. Le deuxième objectif cette thèse sera de *i*) comprendre les mécanismes régulant la perméabilité membranaire de *E. coli* ST131 et *ii*) évaluer leur impact sur la mobilité, la capacité à former du biofilm et la virulence *in vivo* chez le nématode *Caenorhabditis elegans*.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1 Multirésistance des entérobactéries aux antibiotiques

1.1 Définition

Depuis les débuts de l'utilisation des antibiotiques, les bactéries n'ont cessé de développer différentes stratégies de résistance. En Avril 2014, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a publié un texte intitulé « La résistance aux antimicrobiens : rapport mondial sur la surveillance en 2014 » (21). Le rapport met l'accent sur la résistance aux antibiotiques chez sept espèces bactériennes responsables d'infections graves, parmi lesquelles figurent *E. coli* et *K. pneumoniae*.

Par définition, la multirésistance aux antibiotiques (MDR) caractérise les bactéries qui présentent une résistance, naturelle ou acquise, à au moins 3 classes d'antibiotiques (22). Echappant aux traitements de première intention, les infections à bactéries MDR entraînent un retard à la mise en place d'une antibiothérapie adaptée et contribuent à une augmentation de la mortalité des patients (23).

D'une façon générale, la résistance acquise aux antibiotiques fait appel à trois grandes catégories de mécanismes :

- inactivation de l'antibiotique liée à la production d'enzymes,
- modification de la cible de l'antibiotique,
- défaut d'accumulation de l'antibiotique, due soit à un défaut de pénétration intracellulaire (diminution de l'influx membranaire), soit à l'expulsion de l'antibiotique hors de la bactérie (efflux membranaire).

1.2 Résistance par inactivation enzymatique de l'antibiotique

Chez les entérobactéries, ce mécanisme de résistance majeur concerne plusieurs familles d'antibiotiques, principalement les β -lactamines et les aminosides, mais également les quinolones et le chloramphénicol.

1.2.1 Résistance aux β -lactamines

Les β -lactamines agissent par inhibition de la biosynthèse du peptidoglycane, réseau complexe formé de chaînes polysaccharidiques reliées entre elles par des ponts peptidiques, qui est un constituant essentiel de la paroi bactérienne. Les cibles moléculaires des β -lactamines sont des enzymes appelées « protéines de liaison aux pénicillines » (PLP), qui

catalysent des réactions de transglycosylation et de transpeptidation assurant la formation du peptidoglycane (24). L'inhibition de la synthèse de la paroi entraîne un arrêt de la croissance bactérienne (effet bactériostatique) tandis que l'effet bactéricide des β -lactamines est probablement lié à l'activation d'autolysines (25).

Le principal mécanisme de résistance aux β -lactamines observé chez les entérobactéries est la production d'enzymes inactivatrices, qui hydrolysent la liaison amide au niveau du cycle β -lactame, d'où leur nom de β -lactamases. Les β -lactamases, dont le support génétique peut être chromosomique ou plasmidique, sont produites à l'état de précurseur dans le cytoplasme et deviennent matures en perdant leur peptide signal lors de leur transfert à travers la membrane cytoplasmique. Comme elles ne peuvent pas franchir la membrane externe chez les bactéries à Gram négatif, elles restent concentrées dans l'espace périplasmique où elles inactivent les β -lactamines avant que ces dernières n'atteignent leur cible.

1.2.1.1 Classification des β -lactamases

Au vu du nombre élevé de β -lactamases (voir le site : <http://www.lahey.org/studies>) et de la diversité de ces enzymes, plusieurs classifications ont été proposées. Deux d'entre elles sont actuellement utilisées : la classification structurale proposée par Ambler et la classification fonctionnelle de Bush (26, 27).

La classification structurale d'Ambler définit 4 classes de β -lactamases selon la séquence en acides aminés de leur site actif (26). Bien qu'elle ne reflète pas bien la réelle diversité génétique et phénotypique des β -lactamases, cette classification a l'avantage d'être simple et stable dans le temps. Elle distingue :

- les enzymes à sérine active: pénicillinasés inhibées par l'acide clavulanique (classe A), céphalosporinasés inhibées par la cloxacilline (classe C) et oxacillinasés (classe D),
- les métallo-enzymes à zinc inhibées par l'EDTA (classe B).

La classification fonctionnelle de Bush a été élaborée en 1989 et réactualisée à deux reprises, en 1995 et 2010 (27, 28). Elle permet de classer les enzymes sur la base de leur profil de substrat et de leur sensibilité à l'action inhibitrice du clavulanate, du tazobactam et de l'EDTA.

- Le groupe 1 regroupent les enzymes de la classe C d'Ambler, (ou céphalosporinasés codées par les gènes *ampC*), qui ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique. Les enzymes qui appartiennent au sous-groupe 1e dérivent le plus souvent des céphalosporinasés chromosomiques par mutations ponctuelles et possèdent un profil de substrat étendu aux céphalosporines de 3ème génération (C3G).

- Le groupe 2 est de loin le plus vaste et comporte des β -lactamases le plus souvent inhibées par l'acide clavulanique. La plupart de ces enzymes ont un support plasmidique et toutes appartiennent à la classe moléculaire A, exceptées les oxacillinases qui appartiennent à la classe D.
- Le groupe 3 regroupe les métallob- β -lactamases de la classe B conférant la résistance à la quasi-totalité des β -lactamines (pénicillines, céphalosporines et carbapénèmes) exceptés les monobactames et sont inhibées par les agents chélateurs (EDTA) mais pas par l'acide clavulanique.
- Le groupe 4 rassemble moins d'une dizaine d'enzymes, peu rencontrées à ce jour, insensibles à l'acide clavulanique, et ne pouvant être classées parmi les autres groupes.

Un résumé de ces deux classifications est présenté dans le Tableau 1 (29).

Classe moléculaire (Ambler)	Groupes fonctionnels (Bush & al.)	Type de β -lactamase et exemples représentatifs	Bactéries impliquées	Inhibition par acide clavulanique	Inhibition par EDTA	β -lactamines hydrolysées	β -lactamines stables
β-lactamases à sérine active	2a	Pénicillinasés	Bactéries à Gram positif	++	-	Pénicillines sauf pénicillines M	Pénicillines M, C1G, carbapénèmes
	2b	β -lactamase à large spectre TEM-1 & 2, SHV-1 plasmidiques et chromosomiques	Bactéries à Gram négatif	++	-	Amino-, carboxy- et uréido-pénicillines, C1G, C2G	Céphamycines, C3G, moxalactam, carbapénèmes, aztreonam
	2be	β -lactamases à spectre élargi aux C3G et à l'aztreonam SHV-2 à 9, TEM-3 à 29, VEB-1, plasmidiques	Entérobactéries, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	++	-	Idem 2b + C3G et aztreonam	Céphamycines, moxalactam, carbapénèmes
	2br	β -lactamases à large spectre résistant à l'acide clavulanique TRI : dérivé TEM-30 à -41, plasmidiques	Entérobactéries	-	-	Idem 2b + associations aux inhibiteurs de β -lactamases	Idem 2b
	2c	Carbénicillases PSE-1, PSE-3, PSE-4 plasmidiques	Bactéries à Gram négatif	+	-	Idem 2b	Idem 2b
	2e	Céphalosporinasés chromosomiques inhibées par l'acide clavulanique - Cefuroxime Cum A (<i>P. vulgaris</i>), - L2 (<i>S. maltophilia</i>)	Bactéries à Gram négatif (surtout entérobactéries)	++	-	Amino-, carboxy- et uréido-pénicillines, C1G, C2G, certaines C3G	Ceftazidime, céphamycines, aztreonam, carbapénèmes
	2f	Carbapénémases à site actif sérine et inhibées par l'acide clavulanique Ex : IMI-1, NMC-A, chromosomiques	Entérobactéries	+	-	Idem 2b + aztreonam, carbapénèmes et certaines C3G	Certaines C3G
Classe C	1	Céphalosporinase AmpC chromosomiques (Entérobactéries*, <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Acinetobacter</i> spp.) et plasmidiques (CMY, FOX, MOX, MIR-1...)	Bactéries à Gram négatif	-	-	Toutes les β-lactamines sauf les carbapénèmes	Carbapénèmes
Classe D	2d	Oxacillinasés OXA-1 à -20 plasmidiques et chromosomiques	Bacilles à Gram négatif	V	-	Idem 2b (+ parfois C3G, aztreonam ou carbapénème)	Variable
Pas de classe attribuée	4	Enzymes indéterminées Ex : enzymes chromosomiques de <i>C. jejuni</i> , <i>C. cepacia</i> ...	Espèces variées	-	-	Variable	Variable
β-lactamases Zinc-dépendances Classe B	3	Métallo- β -lactamases IMP-1/3 chromosomiques ou plasmidiques, enzymes chromosomiques de <i>Aeromonas</i> spp., <i>Flavobacterium</i> spp., <i>S. maltophilia</i> L1	Bactéries à Gram négatif	-	++	Large profil de substrats dont les carbapénèmes	Variable
Inhibition : inhibiteur fort++, inhibiteur modéré+, négligeable -, V : variable * <i>E. coli</i> (bas niveau), <i>E. cloacae</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>M. morgani</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>H. alvei</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>P. rettgeri</i>							

Tableau 1. Classification des β -lactamases selon Bush et Ambler (27).

1.2.1.2 Les β -lactamases à spectre étendu (BLSE)

Les EBLSE ont été rapportées dès les années 1980 en Europe (30–32). Les BLSE possèdent un spectre de substrat large qui comprend les pénicillines, les céphalosporines ainsi que l'aztréonam, mais qui épargne les céphamycines et les carbapénèmes. La très grande majorité des BLSE sont des enzymes de la classe A d'Ambler qui sont inhibées par l'acide clavulanique et le tazobactam. Cette propriété se manifeste par une synergie entre les C3G, les céphalosporines de 4^{ème} génération (C4G) ou l'aztréonam et l'acide clavulanique. C'est sur ce phénomène de synergie que reposent les différentes techniques de détection des BLSE de classe A, la plus courante étant la recherche d'une « image de synergie » entre un disque de C3G (ou C4G ou aztréonam) et un disque contenant de l'acide clavulanique.

▪ Les BLSE de type TEM et SHV

Les premières BLSE dérivent des pénicillinases TEM-1 (Temoneira, nom du patient), TEM-2 ou SHV-1 (« SulfHydryl reagent Variable ») par des mutations qui modifient la configuration du site actif de l'enzyme et entraînent un élargissement du spectre de substrat aux C3G, C4G et à l'aztréonam. SHV-1 correspond à un gène de pénicillinase chromosomique de *K. pneumoniae* transposé sur un plasmide. En revanche, l'origine de TEM-1 et TEM-2 reste à ce jour inconnue.

Chez les β -lactamases de type TEM, les principales mutations responsables du phénotype BLSE surviennent aux positions 238 (Gly→Ser), 240 (Glu→Lys), 104 (Glu→Lys) et 164 (Arg→Ser ou Arg→His) (Figure 1 et site <http://www.lahey.org/studies>) (33). A l'heure actuelle, les variants BLSE les plus fréquemment retrouvés au sein de cette famille sont TEM-24, TEM-52 et TEM-4 (2).

Au sein des enzymes de type SHV, les mutations les plus fréquemment impliquées dans le phénotype BLSE surviennent aux positions 238 (Gly→Ser) et 240 (Glu→Lys) (Figure 2 et site <http://www.lahey.org/studies>) (33). Les variants les plus fréquents sont SHV-12 et SHV-5 (2).

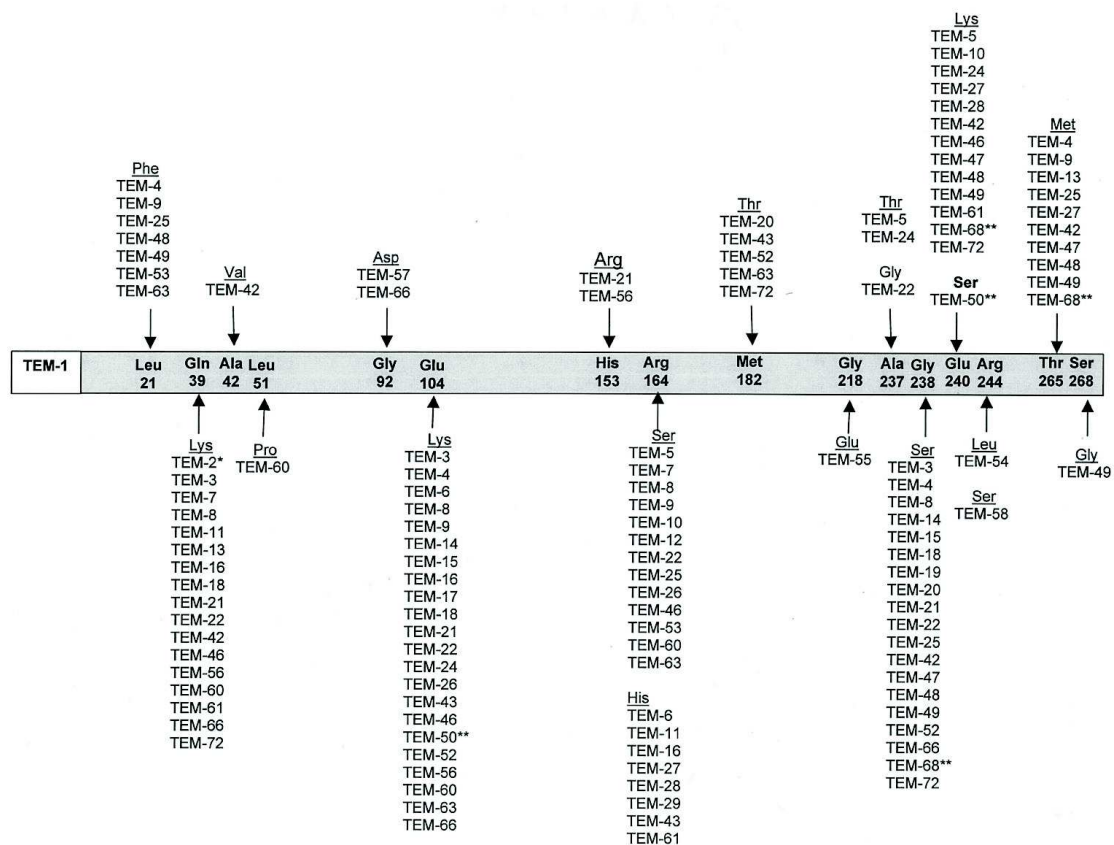


Figure 1. Substitutions en acides aminés décrites chez les BLSE de type TEM (33).
 *variant péricillinase ; **variant TRI.

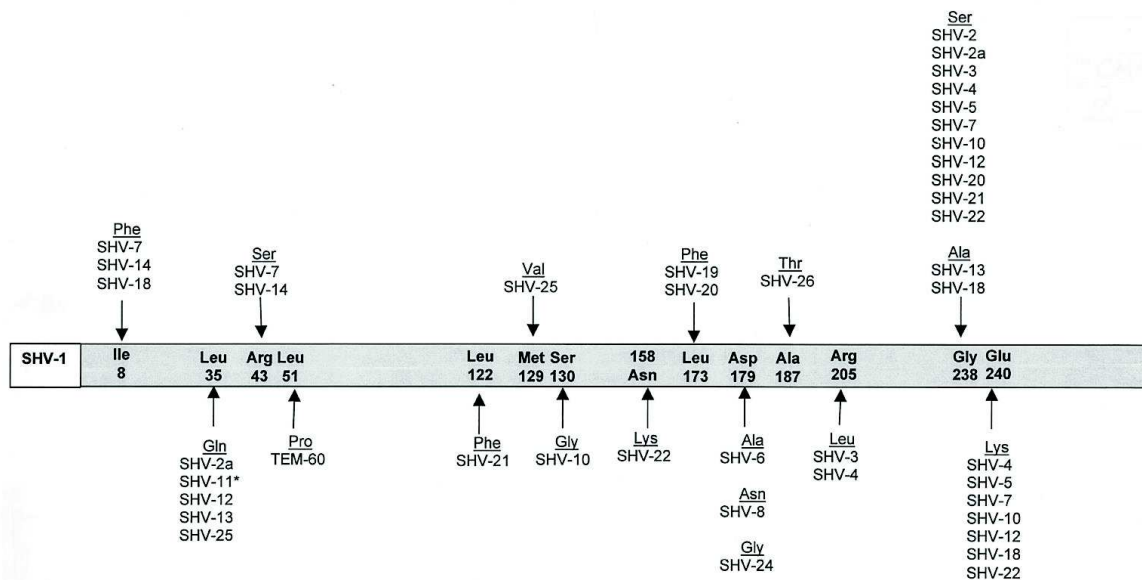


Figure 2. Substitutions en acides aminés décrites chez les BLSE de type SHV (33).
 *variant péricillinase.

▪ Les BLSE de type CTX-M

Les enzymes de type CTX-M (actives sur le céfotaxime, décrites pour la première fois à Munich) sont des β -lactamases à sérine active de classe A. Leur première description date de 1986 au Japon (34). L'enzyme avait alors été baptisée FEC-1 (« fecal *E. coli* »), avant d'être reliée plus tard à l'enzyme CTX-M-3 identifiée en Pologne (35).

Les CTX-M hydrolysent préférentiellement le céfotaxime par rapport à la ceftazidime (35). Ce spectre d'activité est lié au fait que le site catalytique n'est pas accessible à la volumineuse molécule de ceftazidime, contrairement aux pénicillines, aux C1G, aux C2G et au céfotaxime. Cependant, un certain nombre de variants sont capables d'hydrolyser la ceftazidime (CTX-M-15, CTX-M-16, CTX-M-27). Selon la similarité de leurs séquences protéiques, on recense environ 120 variants (35) qui se répartissent en 5 clusters (Figure 3):

- CTX-M-1 (ou groupe 1) qui comprend notamment les variants CTX-M-1, -3, 10 et -15,
- CTX-M-2 (ou groupe 2) qui comprend les variants CTX-M-2 et -44 (ou Toho-1),
- CTX-M-8 (ou groupe 8),
- CTX-M-9 (ou groupe 9) qui comprend les variants CTX-M-9, -14 et -27,
- CTX-M-25 (ou groupe 25).

Les analyses génétiques ont montré que les gènes progéniteurs appartiennent au genre *Kluyvera*, des entérobactéries rarement isolées en bactériologie médicale (35, 36). Ainsi le *phylum* CTX-M-2 dérive de la β -lactamase naturelle de *K. ascorbata* alors que le *phylum* CTX-M-8 provient de *K. georgiana* (37). Cette espèce serait également à l'origine du groupe 9 (38).

De multiples mécanismes génétiques sont probablement impliqués dans la capture et la dissémination des gènes *bla*CTX-M, la séquence d'insertion *ISEcp1* et les intégrons complexes de classe 1 ayant joué un rôle majeur dans ces événements (39, 40).

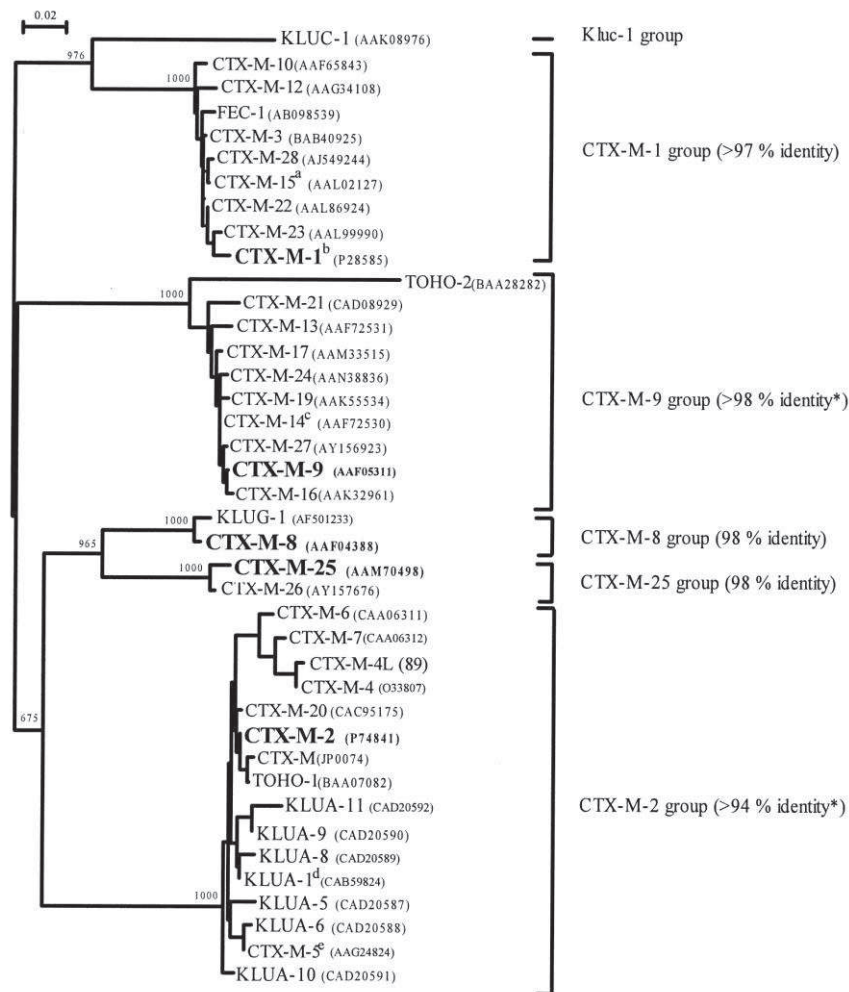
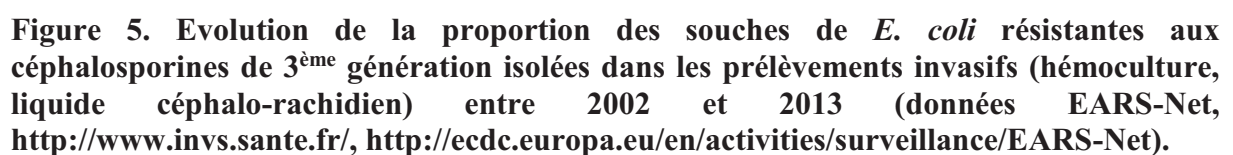


Figure 3. Dendrogramme des enzymes de type CTX-M (35).

Depuis le début des années 2000, l'épidémiologie mondiale des EBLSE a été bouleversée. Les CTX-M sont actuellement les BLSE les plus répandues dans le monde (1, 2). Elles ont supplanté les enzymes qui étaient dominantes depuis l'apparition des BLSE en 1984, c'est-à-dire les BLSE dérivées des pénicillinases TEM et SHV. La répartition des différents clusters varie en fonction des régions du globe (1, 41), les groupes 1 et 9 étant les plus représentés en Europe, en particulier les variants CTX-M-3, -15, -9 et -14 (Figure 4).

Par ailleurs, les β -lactamases de type CTX-M ont diffusé chez l'espèce *E. coli*, espèce jusqu'alors peu concernée par la production de BLSE. La proportion de souches résistantes aux C3G dans cette espèce a progressivement augmenté au cours de la dernière décennie, comme le montrent les données nationales recueillies depuis 2002 dans le cadre du réseau européen de surveillance de la résistance aux antibiotiques (EARS-Net, anciennement EARSS; <http://www.ecdc.europa.eu>) : 1,9% en 2002 vs 9,5% en 2013 (Figure 5) (42).



▪ Les autres BLSE de classe A

Un certain nombre de BLSE de classe A, dites « mineures », ont été décrites. Ces dernières sont beaucoup moins fréquentes que les BLSE de type TEM, SHV et CTX-M et présentent des distributions différentes (33, 43):

- les BLSE de type PER (« *Pseudomonas* Extended Resistance ») qui sont le plus souvent détectées dans des souches de *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* ou *S. enterica*,
- les enzymes de type VEB (« Vietnam Extended-spectrum β -lactamase »), qui ont été impliquées dans une épidémie à *A. baumannii* en France, à *Proteus mirabilis* en Corée et à *Enterobacter cloacae* en Chine,
- les enzymes GES (« Guyana Extended-Spectrum β -lactamase ») initialement décrites dans une souche de *K. pneumoniae* à la fin des années 1990. Certains variants ont un profil hydrolytique étendu aux carbapénèmes (GES-2 et GES-8) ou aux carbapénèmes et céphamycines (GES-4, -5, -6),
- les SFO-1 (*Serratia fonticola*), BES-1 (« Brazilian Extended-Spectrum β -lactamase »), BEL-1 (« Belgium extended-spectrum β -lactamase ») et TLA-1 (Tlahuicas, tribu indienne) sont rarement isolées à ce jour.

▪ Les BLSE de type OXA (Oxacillinases)

Les enzymes de la classe D d'Ambler (ou oxacillinases, OXA) hydrolysent fortement la cloxacilline, l'oxacilline et la méticilline. Elles se caractérisent classiquement par un phénotype de pénicillinase peu sensible aux inhibiteurs.

Certaines enzymes de type OXA, qui dérivent par mutation(s) ponctuelle(s) des enzymes OXA-10, OXA-13 et OXA-2, ont un spectre d'activité étendu aux C3G et C4G (43) (voir le site: <http://www.lahey.org/studies>). La faible activité des inhibiteurs sur ces enzymes rend leur détection phénotypique difficile. A l'inverse des BLSE de la classe A qui sont principalement isolées chez les entérobactéries, les BLSE de type OXA sont majoritairement isolées chez *P. aeruginosa* ce qui confère aux souches de cette espèce une résistance de haut niveau à la ceftazidime (44).

1.2.1.3 Les céphalosporinases plasmidiques

La première céphalosporinase plasmidique, CMY-1 (« β -Lactamase active on CephaMYcins »), a été décrite en 1989 dans une souche de *K. pneumoniae*, espèce ne

produisant pas de céphalosporinase naturelle (45). D'autres types de céphalosporinases plasmidiques ont ensuite été identifiées à travers le monde, dans des souches cliniques hospitalières ou communautaires, d'origine animale ou environnementale (46, 47). Les espèces les plus touchées sont *E. coli* et *K. pneumoniae* ainsi que *S. enterica* ou *P. mirabilis* (203, 179). Ces enzymes sont classées en six groupes sur la base de leur homologie avec les céphalosporinases chromosomiques de certaines espèces bactériennes (46):

- le groupe *Citrobacter freundii*, qui comprend de nombreuses enzymes comme CMY-2 (céphalosporinase la plus répandue dans le monde), CMY-3 à -7, CMY-12 à -18, CMY-21 à -23, LAT-1 et BIL-1,
- le groupe *Aeromonas*, subdivisé en deux sous-groupes, celui des enzymes de type FOX et celui des enzymes MOX-1 et -2, CMY-1, CMY-8 à -11 et CMY-19,
- le groupe *Enterobacter* qui comprend les céphalosporinases ACT-1 et MIR-1,
- le groupe *Morganella morganii* qui comprend les enzymes inductibles de type DHA, car le gène *ampC* est accompagné du gène régulateur *ampR*,
- le groupe *Hafnia alvei* qui comprend les enzymes de type ACC.

1.2.1.4 Les carbapénémases

Les carbapénèmes sont des β -lactamines à large spectre qui constituent la dernière ligne du traitement efficace des infections à EBLSE (5, 48).

Les enzymes qui possèdent une activité hydrolytique vis-à-vis des carbapénèmes, les carbapénémases, appartiennent à trois des quatre classes d'Ambler (A, B et D) (49). Comme les souches qui produisent ces enzymes sont fréquemment résistantes à d'autres classes d'antibiotiques, elles constituent une menace sanitaire par risque d'impasse thérapeutique. L'émergence des carbapénémases chez les entérobactéries au cours de ces dernières années a conduit les autorités sanitaires de certains pays à mettre en place des programmes visant à maîtriser leur diffusion (50).

En France, la maîtrise de la diffusion des entérobactéries productrices de carbapénémase (EPC) fait l'objet de recommandations depuis 2009, d'abord de la part du Comité de Lutte contre les Infections Nosocomiales (CLIN central) de l'Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (Février 2009), puis de la part du Haut Conseil de la Santé Publique (Mai 2010, actualisé en Novembre 2010). Depuis décembre 2010, ce programme de lutte est encadré par la circulaire n°DGS/RI/DGOS/PF/2010/413 du 6 décembre 2010 relative à la mise en œuvre de mesures de contrôles des cas importés d'EPC (avec deux rappels : Instruction

n°DGS/DUS/RIS/2011/224 datant du 26 août 2011 et Instruction n°DGOS/PF2/DGS/RI1/2014/08 du 14 janvier 2014). Ce programme de lutte contre la diffusion des EPC doit être mis en œuvre dans chaque établissement de santé du territoire et comprend deux axes :

- une stratégie de type « *search and destroy* » qui cible les patients rapatriés sanitaires et les patients ayant été hospitalisés en dehors du territoire national au cours des 12 derniers mois. Cette stratégie repose essentiellement sur la recherche systématique du portage d'EPC, et l'isolement prophylactique de ces patients ;
- une politique de bon usage des carbapénèmes.

Même si les cas de patients colonisés ou infectés par une EPC sont encore peu fréquents en France, une très nette augmentation des signalements a été observée ces cinq dernières années (Figure 6, <http://www.invs.sante.fr/>). Entre 2004 et 2011, la plupart des épisodes signalés étaient des cas sporadiques et faisaient suite au rapatriement d'un patient ayant été hospitalisé dans un pays en situation endémique (51). Actuellement, d'après le dernier bilan de l'Institut national de Veille Sanitaire (InVS), la proportion des épisodes d'EPC sans lien du cas index avec l'étranger (ni hospitalisation, ni voyage à l'étranger) est estimée à 48% (Figure 6).

Depuis 2004, l'enzyme OXA-48 est la plus fréquemment identifiée en France (77% des épisodes, N=1625) suivie des enzymes NDM (13%) et KPC (6%).

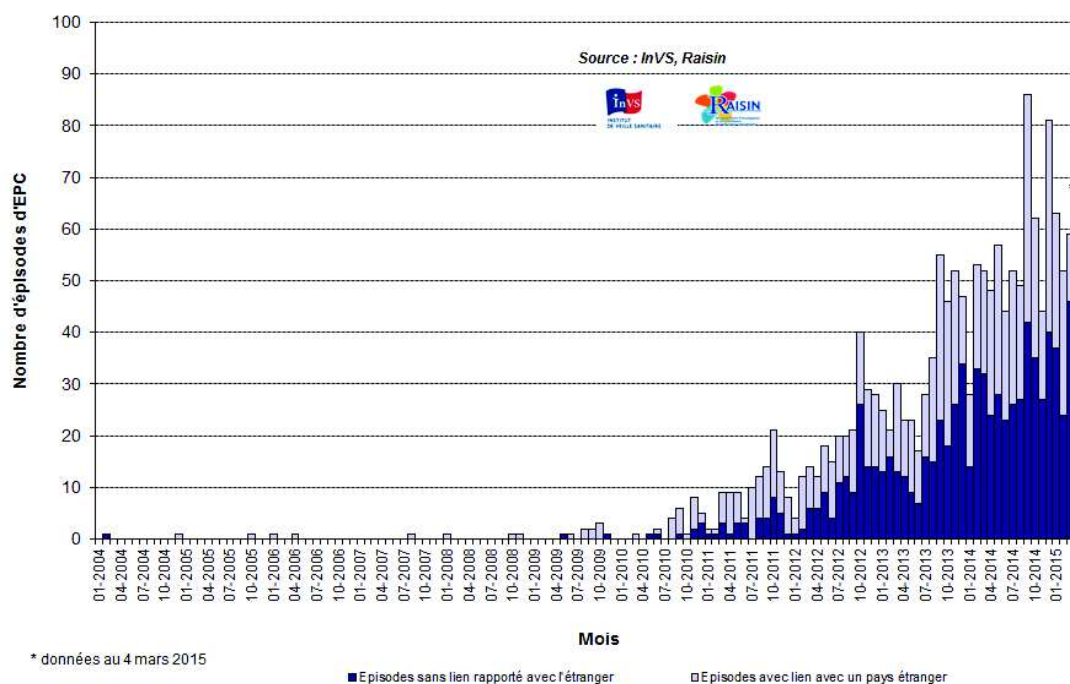


Figure 6. Nombre d'épisodes impliquant des entérobactéries productrices de carbapénémases en France signalés à l'InVS entre 2004 et 2015, selon la mise en évidence ou non d'un lien avec un pays étranger : bilan du 4 Mars 2015 (N=1625).

■ Les carbapénémases de la classe A d'Ambler

Les carbapénémases de classe A sont partiellement inhibées par l'acide clavulanique (49).

Parmi ces enzymes, on compte d'une part les carbapénémases d'origine chromosomiques telles que les enzymes NmcA (*E. cloacae*), Sme (*Serratia marcescens*), IMI-1 (*E. cloacae*) et SFC-1 (*S. fonticola*), et d'autre part des enzymes acquises, telles que les carbapénémases de type KPC, IMI-2 et certains variants GES.

Les enzymes de type KPC (« *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase ») sont les carbapénémases de classe A les plus fréquemment identifiées en Bactériologie clinique. Le premier variant de cette famille a été identifié en Caroline du Nord, aux Etats-Unis en 1996 (52), puis a diffusé dans les états voisins de la côte Est des Etats-Unis, à Porto Rico, en Colombie, en Israël, en Grèce et en Chine (53–57) (Figure 62). Les carbapénémases de type KPC sont majoritairement produites par des souches de *K. pneumoniae* d'origine hospitalière, mais dans une moindre proportion, elles peuvent être isolées chez d'autres espèces d'entérobactéries et chez *P. aeruginosa* (57). Le gène *blaKPC* est le plus souvent localisé au sein de transposons (Tn4401 pour *blaKPC-2*) eux-mêmes portés par des plasmides conjugatifs. Le clone de *K. pneumoniae* ST258 (« Sequence Type » 258), dont la distribution

est mondiale, a probablement joué un rôle important dans la diffusion des enzymes KPC-2 et KPC-3 (58–60). Les isolats producteurs de KPC sont actuellement endémiques aux Etats-Unis, en Colombie, en Grèce et en Italie (Figure 7).

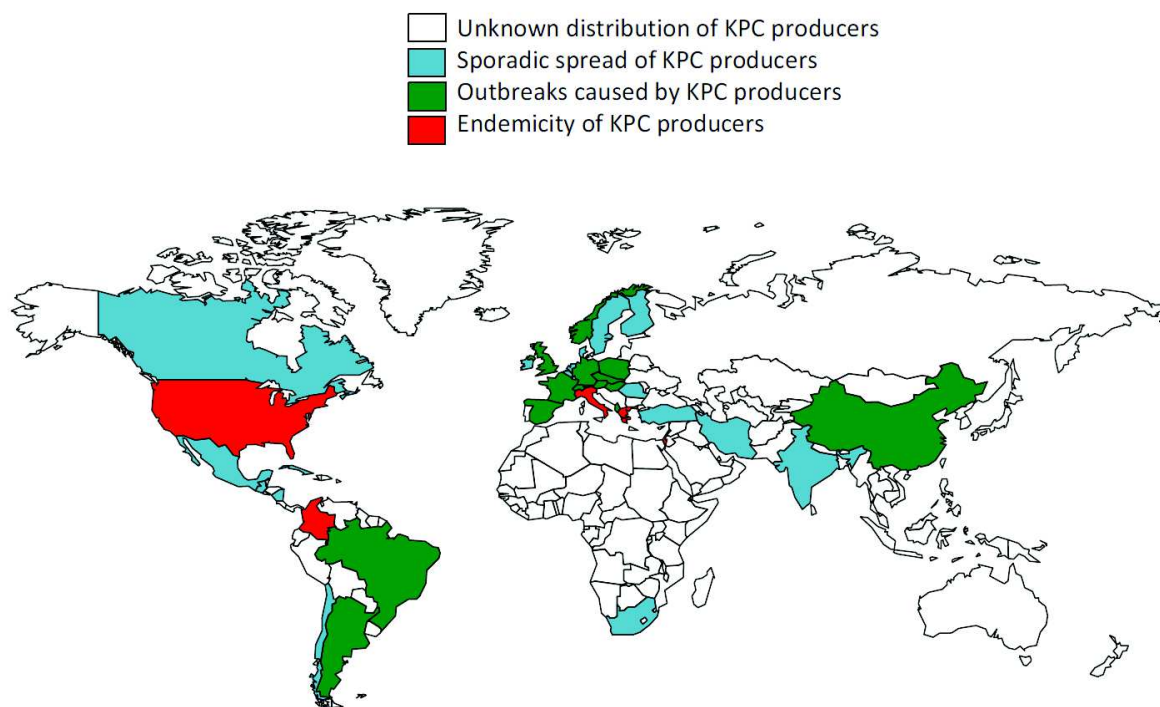


Figure 7. Distribution géographique des isolats producteurs de carbapénémases KPC (4).

▪ Les carbapénémases de la classe B d'Ambler

Les Métallo- β -Lactamases (MBL) ont été décrites pour la première fois en 1966, quand Sabbath et Abrahamman montrèrent que l'activité de type céphalosporinase de l'enzyme produite par un isolat de *Bacillus cereus* était inhibée par l'EDTA (61). Depuis, les MBL impliquées dans la résistance acquise aux carbapénèmes ont émergé chez les entérobactéries, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* et d'autres espèces non fermentaires (62).

Les β -lactamases de classe B sont classées en trois sous-classes, B1, B2 et B3, sur la base de l'alignement de leurs séquences en acides aminés et de la structure de leurs sites actifs (63, 64). Les enzymes appartenant aux sous-classes B1 et B3 possèdent un site actif contenant deux ions zinc et ont un spectre large. Ces enzymes hydrolysent la plupart des β -lactamines, y compris les carbapénèmes, mais sont inactives sur les monobactames. Ces enzymes présentent par ailleurs la particularité de ne pas être inhibées par les inhibiteurs classiques des β -lactamases comme l'acide clavulanique et le tazobactam qui se comportent comme de

mauvais substrats (65). Les enzymes de la sous-classe B2 ont un site actif contenant un seul ion zinc et sont des carbapénémases strictes qui n'hydrolysent efficacement que les carbapénèmes et qui ont une faible activité envers les pénicillines et les céphalosporines. Les MBL sont essentiellement représentées, chez les entérobactéries, par les enzymes NDM (« New Delhi Metallo- β -lactamase »), VIM (« Verona Integron-encoded Metallo- β -lactamase ») et IMP (« IMiPemenase »).

L'enzyme NDM-1 a été décrite pour la première fois en 2008 dans une souche de *K. pneumoniae* chez un patient Suédois ayant séjourné en Inde, pays dans lequel cette enzyme a diffusé très rapidement, tant en milieu hospitalier qu'en milieu communautaire et dans l'environnement (66–68). Les Balkans, le Moyen-Orient, l'Afrique et la Chine constitueraient des réservoirs secondaires à l'origine de la dissémination de ces enzymes (69–71). Depuis 2010, des souches cliniques d'EPC de type NDM impliquant différentes espèces ont été isolées sur tous les continents (Figure 8) (4). Si *K. pneumoniae* est la principale espèce concernée dans les infections hospitalières, *E. coli* est, de manière préoccupante, l'espèce dominante dans les infections communautaires (4).

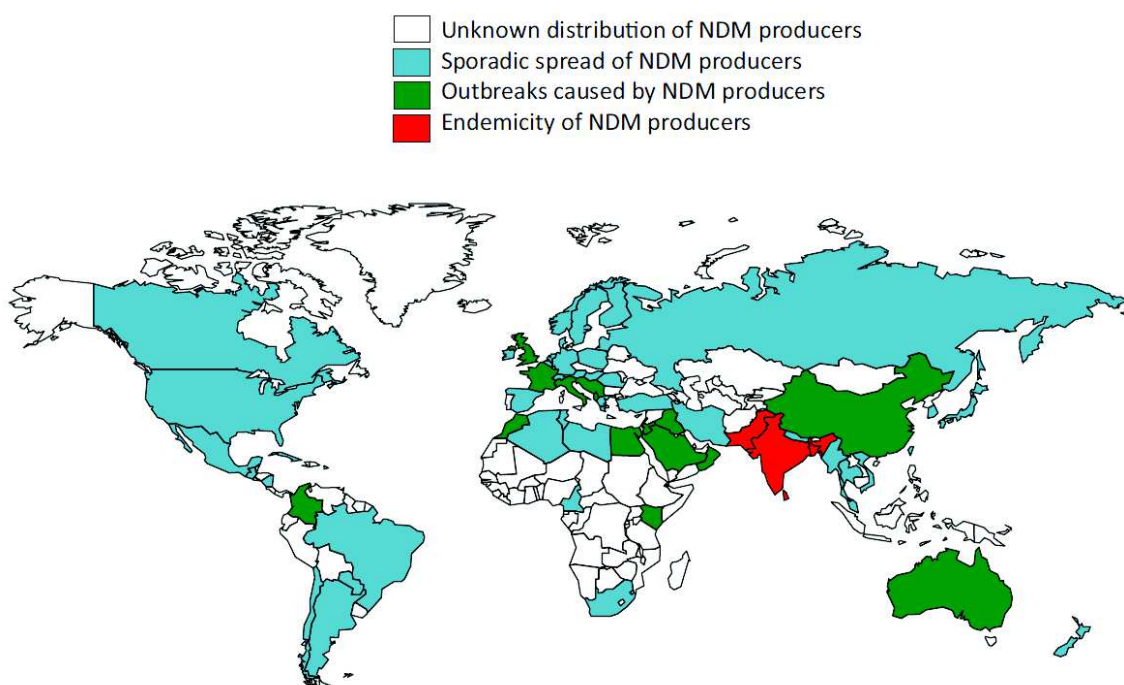


Figure 8. Distribution géographique des isolats producteurs de carbapénémases NDM (4).

L'enzyme VIM-1 a initialement été décrite en 1997 à Vérone, en Italie, chez *P. aeruginosa* (72). À la fin des années 1990 et au début des années 2000, cette enzyme était principalement rapportée dans des souches du genre *Pseudomonas* responsables d'épidémies dans les hôpitaux italiens (73, 74). Rapidement, les enzymes de type VIM, et notamment les variants VIM-1 et -2, ont émergé dans de nombreux pays en Europe chez d'autres bacilles à Gram négatif non fermentaires et chez les entérobactéries (4). C'est actuellement en Grèce que la prévalence de ces enzymes est la plus forte, concernant principalement l'espèce *K. pneumoniae* (75, 76), mais aussi chez de nombreuses autres entérobactéries (77–79) chez *P. aeruginosa* (80) et *A. baumannii* (81). Ce pays étant également confronté à une endémicité des carbapénémases de type KPC, on a vu émerger ces dernières années des souches co-produisant les enzymes KPC-2 et VIM-1 (82, 83). L'Espagne, l'Italie et l'Autriche sont des pays dans lesquels les enzymes VIM ont émergé, au début des années 2000 pour les deux premiers (84, 85) et plus récemment pour le Tyrol autrichien (86, 87). Elles semblent actuellement endémiques en Italie et en Espagne (4). Dans les autres pays européens, aux Etats-Unis, en Afrique du Nord et en Asie du Sud-Est, des cas de portage ou d'infection à entérobactéries productrices de VIM ont été rapportés (Figure 9), ces cas étant le plus souvent importés de Grèce (3, 4).

Les enzymes de type IMP ont été les premières MBL acquises décrites. Chez les entérobactéries, le variant IMP-1 a été décrit pour la première fois en 1991 au Japon, chez *S. marcescens* (88). Depuis, les enzymes IMP ont été identifiées chez d'autres entérobactéries, chez *P. aeruginosa* et *A. baumannii* dans de nombreuses régions du monde (Figure 9) (3, 4). Toutefois, à l'exception de l'Asie du Sud-Est, les épisodes impliquant des EPC de type IMP sont rarement rapportés (4).

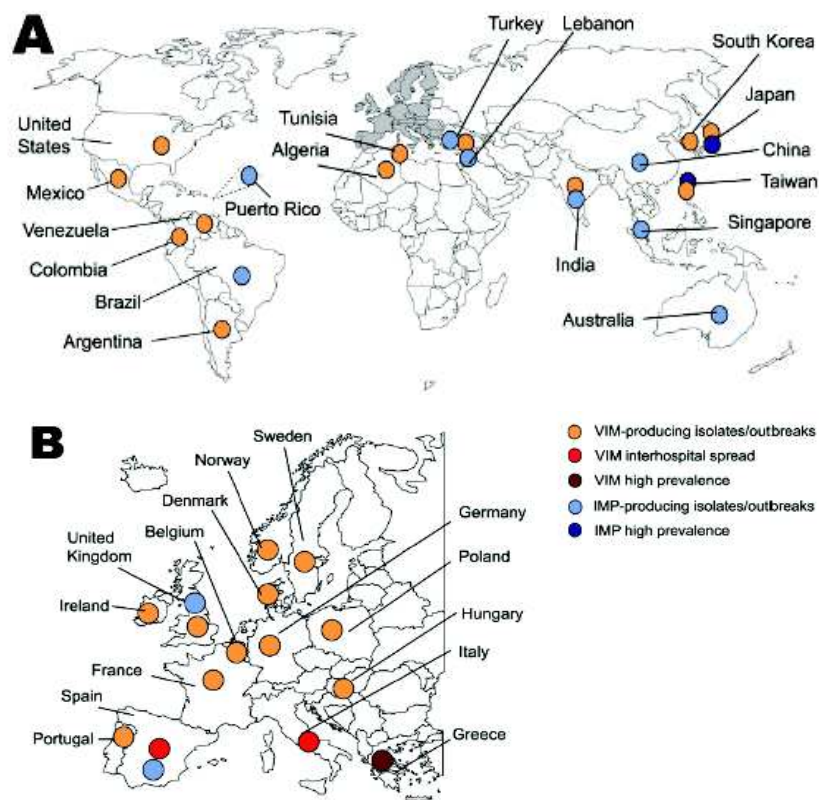


Figure 9. Distribution géographique mondiale (A) et européenne (B) des EPC de type VIM et IMP (3).

▪ Les carbapénémases de la classe D d'Ambler

Certaines oxacillinas, les CHDL (« Carbapenem-Hydrolyzing class D β -Lactamases »), possèdent une activité hydrolytique vis-à-vis des carbapénèmes. Ces oxacillinas se répartissent en plusieurs sous-groupes, parmi lesquels on trouve les enzymes dérivant de OXA-23, de OXA-24, de OXA-48, de OXA-51 et de OXA-58 (89). À l'exception d'OXA-48 et ses variants, les oxacillinas sont principalement retrouvées chez *A. baumannii*.

L'enzyme OXA-48 hydrolyse faiblement les carbapénèmes et n'est associée à un haut niveau de résistance à ces antibiotiques qu'en association avec une imperméabilité membranaire (90). Elle n'est pas inhibée par l'acide clavulanique ou l'EDTA. Elle épargne les C3G, ce qui la rend difficile à détecter, en particulier lorsqu'elle n'est associée, ni à une BLSE, ni à une imperméabilité. L'enzyme OXA-48 a été identifiée pour la première fois en 2003 dans une souche de *K. pneumoniae*, en Turquie (91). Depuis, les EPC de type OXA-48 ont largement diffusé dans de nombreux pays du pourtour méditerranéen et semblent actuellement endémiques en Turquie et en Afrique du Nord (Figure 10) (4). Leur support génétique est généralement un plasmide du groupe IncL/M, diffusant principalement chez *K. pneumoniae* et

E. coli (92). Dans le sous-continent indien, on assiste désormais à la diffusion de l'enzyme OXA-181 qui dérive d'OXA-48 par quatre mutations ponctuelles et possède les mêmes capacités hydrolytiques (93).

Trois autres variants dérivent également de l'enzyme OXA-48. Le variant OXA-204 a été décrit chez plusieurs isolats de *K. pneumoniae* hébergés par des patients ayant un lien avec la Tunisie ou l'Algérie (4, 94). Le variant OXA-232 a été identifié en France chez des patients rapatriés d'Inde (95). Ses capacités d'hydrolyse des carbapénèmes semblent inférieures à celles d'OXA-181, dont il diffère d'une mutation (94). Enfin, les variants OXA-163 et OXA-247 ont récemment émergé en Argentine (96, 97) et, pour OXA-163, en Egypte (98). Leur capacité d'hydrolyse des carbapénèmes est inférieure à celles de l'enzyme OXA-48 mais leur spectre est élargi vis-à-vis des C3G. Par ailleurs, leur activité est partiellement inhibée par l'acide clavulanique.

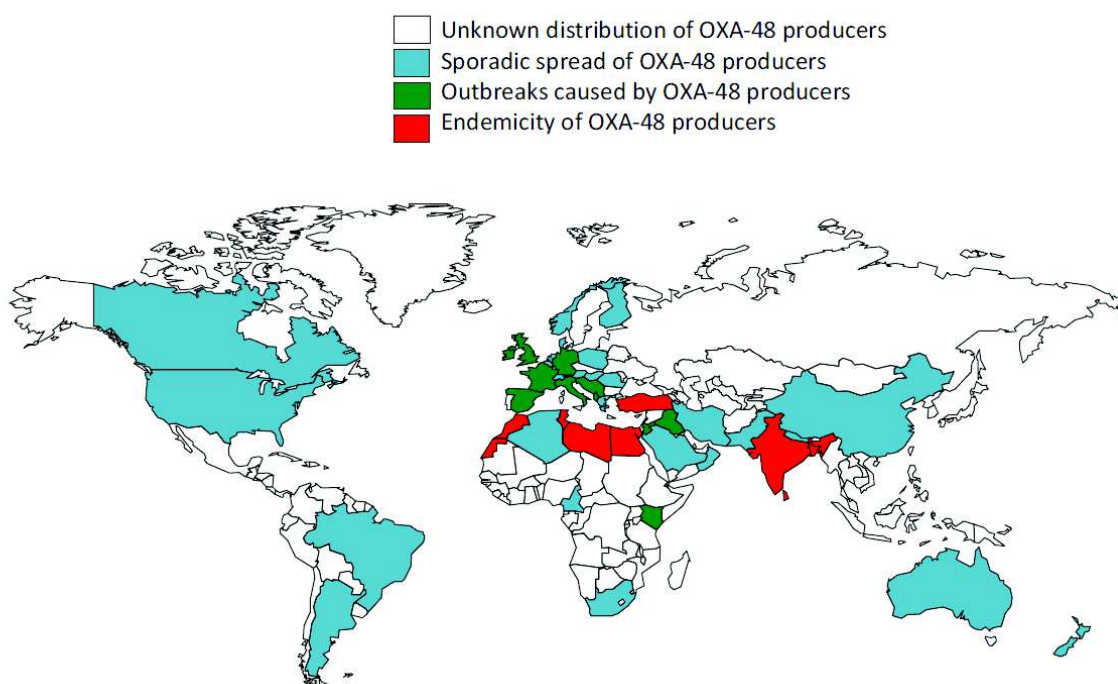


Figure 10. Distribution géographique des isolats producteurs de carbapénémases OXA-48-like (4).

1.2.2 Résistance aux aminosides

Les aminosides sont des antibiotiques bactéricides qui agissent par inhibition de la synthèse protéique, au niveau de toutes les étapes de la traduction. Leur cible est l'ARN 16S du ribosome bactérien (99). Chez les entérobactéries, le mécanisme de résistance aux aminosides prépondérant est la synthèse d'enzymes modificatrices, le plus souvent supportées par des

éléments génétiques mobiles (plasmides, transposons ou cassettes d'intégrons) (100). Ces enzymes sont classées en fonction de la réaction qu'elles catalysent :

- acétylation d'un groupe aminé : « Aminoglycoside N-ACetyltransferase » (AAC)
- phosphorylation d'un groupement hydroxyle : « Aminoglycoside O-PHosphotransferase » (APH),
- nucléotidylation d'un groupement hydroxyle : « Aminoglycoside O-NucleotidylTransferase » (ANT).

Selon leur profil de substrats, ces enzymes sont responsables de phénotypes de résistance parfois caractéristiques (100). La production des enzymes les plus prévalentes, AAC(3)-II et AAC(6')-Ib, semble fréquemment associée à celle des BLSE de type CTX-M (101, 102).

Enfin, un nouveau variant d'acétyltransférase, l'AAC(6')-Ib-cr, a été décrit en 2003 dans une souche de *E. coli* en Chine (103, 104). Capable d'inactiver aussi bien les aminosides que certaines fluoroquinolones, notamment la ciprofloxacine, ce variant a été identifié dans de nombreuses espèces d'entérobactéries à l'échelle mondiale (105–107).

En 2013, l'EARS-Net rapportait des taux de résistance aux aminosides de 26,7% et 7,8% parmi les souches de *K. pneumoniae* et *E. coli* isolées d'hémocultures en France (Figure 11) (42).

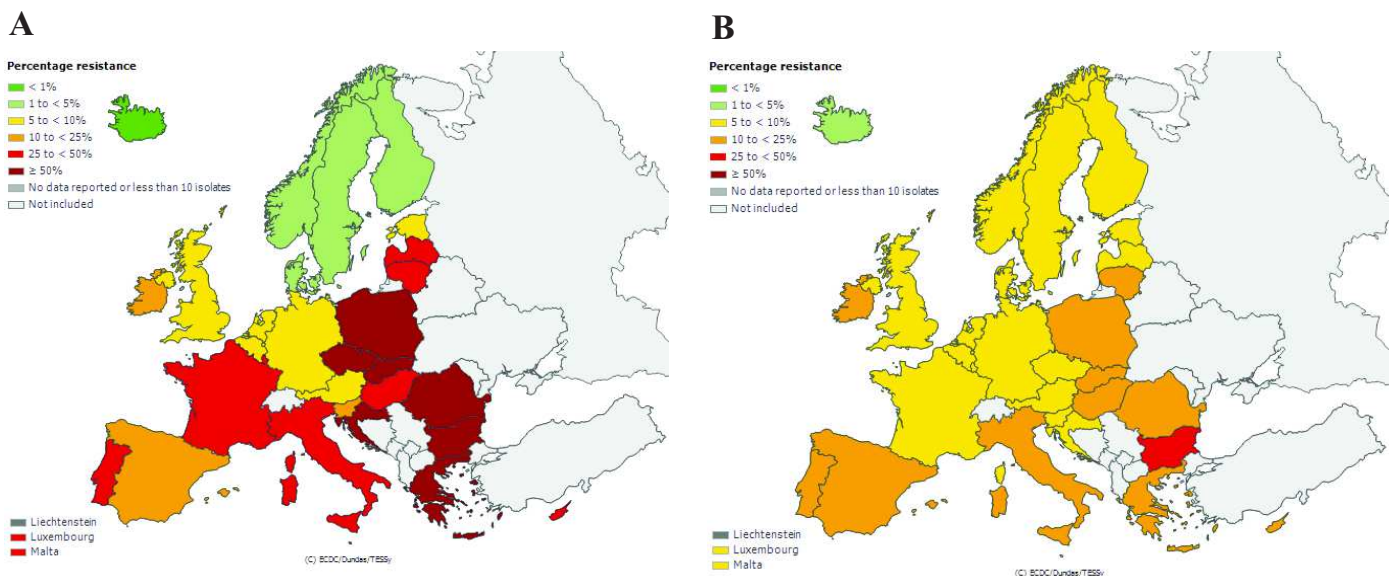


Figure 11. Proportion de souches de *K. pneumoniae* (A) et *E. coli* (B) résistantes aux aminosides isolées dans les infections invasives en 2013 en Europe (42).

1.2.3 Résistance au chloramphénicol

La résistance enzymatique concerne également le chloramphénicol, inactivé par des Chloramphénicol AcétylTransférases (CAT). Les gènes codant ces enzymes sont souvent intégrés dans des éléments génétiques mobiles de type intégrons ou transposons, dont le support peut être chromosomique ou plasmidique (108).

1.3 Résistance par modification de la cible de l'antibiotique

Ce phénomène recouvre l'altération de la cible de l'antibiotique, par mutation ou bien par modification enzymatique, la protection de la cible et la synthèse d'une nouvelle cible insensible à l'antibiotique. Il peut concerner, là encore, différentes familles d'antibiotiques.

1.3.1 Résistance aux quinolones

La résistance acquise aux quinolones est due majoritairement à des mutations chromosomiques dans les gènes codant leur cibles intracellulaires, les topoisomérases de type II, que sont l'ADN gyrase (formée des sous-unités GyrA et GyrB) et l'ADN topoisomérase IV (ParC et ParE) (109). Chez les entérobactéries, ces mutations touchent préférentiellement le gène *gyrA*, puis *parC*. Elles se concentrent dans une région très conservée de ces deux gènes, appelée « Quinolone Resistance-Determining Region » (QRDR). De telles modifications entraînent une modification des structures secondaire et tertiaire des sous-unités GyrA et ParC se traduisant par une diminution d'affinité des complexes ADN-enzyme pour les quinolones (109, 110). La résistance aux quinolones est graduelle et fonction du nombre de mutations observées dans les QRDRs (109).

Le premier cas de résistance plasmidique transférable aux quinolones (PMQR, « Plasmid-Mediated Quinolones Resistance ») a été rapporté en 1998, chez une souche de *K. pneumoniae* isolée d'urines en Alabama (111). Caractérisé quelques années plus tard, le gène *qnr* code une protéine appartenant à la famille des pentapeptides qui agit en protégeant l'ADN gyrase de la fixation des quinolones (112). Cinq familles de protéines Qnr, chacune composée de différents variants, ont été isolées à ce jour chez les entérobactéries : QnrA, QnrB, QnrC, QnrD et QnrS (113). Bien que le niveau de résistance impliquant ce mécanisme soit assez faible (concentrations minimales inhibitrices (CMI) augmentées d'un facteur 4 à 16), l'apparition de mutants résistants aux quinolones chez les souches hébergeant ce plasmide est 100 fois plus fréquente que chez les souches ne l'hébergeant pas (114, 115).

En France, parmi les souches isolées d'hémocultures en 2013, l'EARS-Net rapportait des taux de résistance aux fluoroquinolones de 29,4% chez *K. pneumoniae* et 16,7% chez *E. coli* (Figure 12) (42).

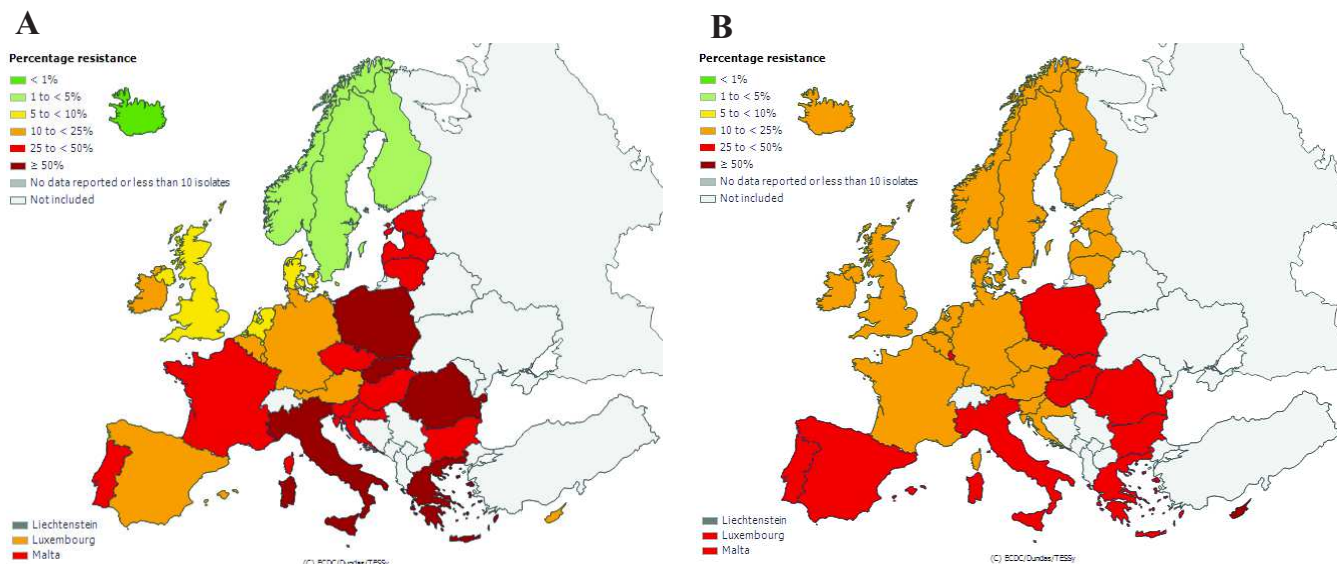


Figure 12. Proportion de souches de *K. pneumoniae* (A) et *E. coli* (B) résistantes aux fluoroquinolones isolées dans les infections invasives en 2013 en Europe (42).

1.3.2 Résistance à la tétracycline et aux aminosides

L'altération des constituants du ribosome bactérien peut être à l'origine d'une résistance aux antibiotiques inhibiteurs de la synthèse protéique, essentiellement la tétracycline et les aminosides.

La tétracycline se lie au niveau de la protéine S7 et de l'ARNr 16S, qui constituent la sous-unité 30S du ribosome, et inhibe la phase d'élongation. Le gène *tet(M)*, localisé sur un transposon conjugatif, code une protéine cytoplasmique qui se fixe sur le ribosome et empêche ainsi la liaison de la tétracycline (116).

Enfin, les méthyltransférases de l'ARNr 16S responsables d'une résistance de haut niveau à la grande majorité des aminosides ont été décrites en 2003 chez *K. pneumoniae* (ArmA, « Aminoglycoside resistance methylase ») (117) et *P. aeruginosa* (RmtA, « rRNA methyltransferase ») (118). Dix gènes codant des méthyltransférases ont été décrits à ce jour chez les entérobactéries et les bacilles à Gram négatif non fermentaires : *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtE*, *rmtF*, *rmtG*, *rmtH* et *npmA*. L'association fréquente de l'expression

de ces méthylases avec celle des carbapénémases, en particulier de type NDM, génèrent une panrésistance aux antibiotiques chez les souches qui les produisent (119–122).

1.3.3 Résistance aux sulfamides et au triméthoprine

Les sulfamides et le triméthoprine inhibent la voie de synthèse des folates, qui sont des précurseurs indispensables à la fabrication des acides nucléiques et des protéines. Leurs cibles respectives sont la dihydroptéroate synthétase (DHPS) et la dihydrofolate réductase (DHFR). Chez les entérobactéries, la résistance aux sulfamides et au triméthoprine est principalement causée par l'apport plasmidique d'enzymes DHPS et DHFR additionnelles, insensibles à ces deux antibiotiques et qui peuvent assurer la synthèse des folates en leur présence (123). Des mutations ponctuelles dans le gène codant la DHFR, entraînant des substitutions d'acides aminés responsables d'une moindre affinité de l'enzyme pour le triméthoprine, ont également été décrites.

Les taux de résistance au cotrimoxazole (association triméthoprine et sulfaméthoxazole) concernait plus d'un quart des souches d'entérobactéries isolées dans les infections urinaires non compliquées en Europe et au Brésil entre 2003 et 2006 (124). Dans les infections urinaires communautaires en France, 23,4% des isolats de *E. coli* (N=16328) inclus dans l'enquête Transville ONERBA en 2012 étaient résistants ou de sensibilité intermédiaire au cotrimoxazole (125).

1.4 Résistance par défaut d'accumulation de l'antibiotique

Ce mécanisme de résistance regroupe la diminution de la pénétration intracellulaire de l'antibiotique (impermeabilité), et l'expulsion de l'antibiotique hors de la bactérie (efflux membranaire). Affectant généralement l'activité de diverses classes d'antibiotiques, ce mécanisme est clairement impliqué dans la MDR (15, 126). Les modifications de l'influx et de l'efflux membranaires, leur régulation et leur impact sur le potentiel de virulence des souches seront abordés chez *E. coli* dans le chapitre 4 de ce manuscrit.

Dans la suite de ce travail, nous allons nous intéresser à *E. coli*, une espèce de plus en plus concernée par la résistance aux antibiotiques, et plus particulièrement au clone *E. coli* ST131, l'exemple type d'un clone MDR.

2 *Escherichia coli*

2.1 Taxonomie

E. coli est une bactérie appartenant à la classe des γ -protéobactéries et à la famille des *Enterobacteriaceae*. Elle fut décrite pour la première fois en 1885 par le pédiatre allemand Théodore Escherich (1857-1911) dans les entérites des nourrissons (127). Dénommée « *Bacterium coli commune* », « *Bacillus coli* » ou encore « *Bacterium coli* », Castellani et Chalmers proposèrent en 1919 de renommer cette bactérie *Escherichia coli* en hommage aux travaux d'Escherich (128). Cette dénomination fut officiellement adoptée en 1958 (129).

E. coli est l'espèce type du genre *Escherichia*. Les études d'hybridation ADN/ADN ont conduit à individualiser cinq autres espèces au sein de ce genre : *E. hermannii*, *E. vulneris*, *E. fergusonii*, *E. albertii* et, décrite très récemment, *E. marmotae* (130–134). Ces espèces sont isolées de manière anecdotique en pathologie humaine et possèdent des caractères biochimiques propres permettant de les différencier les unes des autres.

2.2 Caractères bactériologiques

La famille des *Enterobacteriaceae* regroupe des bacilles droits à Gram négatif, non acido-résistants, mesurant 0,3 à 1 μm de diamètre sur 0,5 à 6 μm de long en fonction du stade de croissance. Non sporulés, aéro-anaérobies facultatifs, les entérobactéries possèdent à la fois un métabolisme respiratoire et fermentatif. Elles fermentent le glucose et sont catalase positive, oxydase négative et réduisent les nitrates en nitrites. L'espèce *E. coli* fait partie des entérobactéries mobiles par une ciliature péritriche. Elle est capable de fermenter le lactose et de produire de l'indole. Elle ne fermente pas l'acétoïne et ne possède pas d'uréase. Elle se multiplie très rapidement : dans les conditions optimales, une population peut doubler toutes les 20 minutes. Elle se cultive sur les milieux usuels (gélose trypticase soja, gélose au sang) et ceux spécifiquement utilisés pour l'isolement des entérobactéries (gélouses de Drigalski et Mac Conkey). Macroscopiquement, après 24 h de culture à 37°C, *E. coli* forme des colonies de 1 à 4 mm de diamètre, rondes, lisses et plus ou moins brillantes. Les souches capsulées apparaissent muqueuses. Sur les gélouses contenant du lactose et un indicateur de pH, elles apparaissent Lactose positives.

L'accumulation des connaissances et des techniques sur *E. coli* en a fait un organisme modèle et un outil de laboratoire.

2.3 Habitat

E. coli est une bactérie commune de la microflore commensale intestinale de l'homme et de la plupart des animaux à sang chaud (mammifères et oiseaux) (135, 136). Elle colonise de manière asymptomatique le tractus digestif de l'Homme dans les premières heures qui suivent la naissance et constitue dès lors l'espèce bactérienne dominante de la flore anaérobie facultative du colon humain (137, 138). Sa niche écologique se trouve dans la couche de mucus sécrétée par l'épithélium du côlon où elle assure, avec les autres composants de la microflore, une barrière de protection de la muqueuse (139). La concentration en *E. coli* par grammes de selles varie d'un individu à un autre de 10^7 à 10^9 unités formant des colonies (UFC). Elle est plus faible chez les autres mammifères (140).

E. coli peut transiter dans l'eau et les sédiments. Il est utilisé comme un indicateur de la contamination fécale de l'eau. On estime que la moitié de la population totale des *E. coli* réside au niveau de ces habitats secondaires environnementaux (141), au sein desquels certaines souches peuvent être sélectionnées et disséminer naturellement (142).

E. coli, et plus largement les coliformes thermo-tolérants, sont également recherchés dans les aliments comme indicateurs de contamination fécale.

2.4 Pathogénicité et plasticité du génome

E. coli est une espèce commensale qui interagit avec son hôte dans une relation mutualiste. Cependant, *E. coli* peut également être un pathogène opportuniste ou un pathogène obligatoire du fait de l'expression de facteurs de virulence spécifiques. Les souches pathogènes opportunistes ou obligatoires ont développé différents modes d'interaction avec leur hôte se traduisant par des signes cliniques variés. Elles sont classiquement séparées en deux groupes : les *E. coli* pathogènes intestinaux (InPEC) responsables de gastro-entérites et les *E. coli* pathogènes extra-intestinaux (ExPEC) responsables d'infections urinaires, de péritonites, de pneumonies nosocomiales, de méningites ou encore de sepsis. Sur la base des modes d'interaction hôte/bactérie et des signes cliniques de l'infection, les souches sont classées en « pathovars » ou « pathotypes » qui regroupent des souches de sérotypes spécifiques (Figure 13) (143).

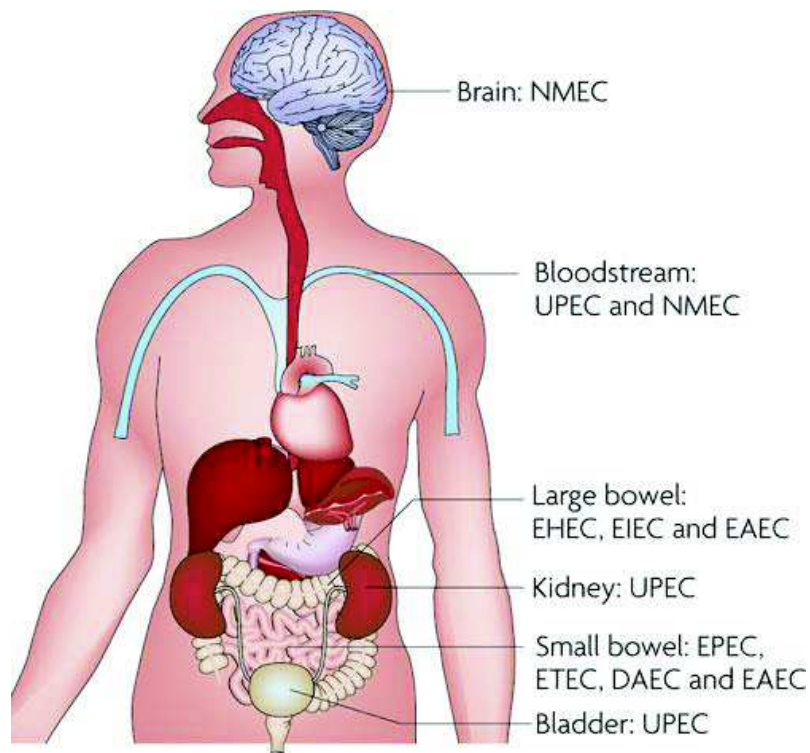


Figure 13. Sites d'infection des différents pathovars de *Escherichia coli* (143).

2.4.1 Les *Escherichia coli* pathogènes intestinaux

Les InPEC sont à l'origine de syndromes diarrhéiques sévères, notamment chez l'enfant, dans les pays en développement. Ils sont responsables de deux millions de morts par an dans le monde (144).

Actuellement, les InPEC sont classés en six pathotypes :

- les EPEC pour « Enteropathogenic *E. coli* », premier pathotype décrit historiquement et responsable de diarrhées aqueuses,
- les EHEC pour « Enterohaemorrhagic *E. coli* », agents de colites hémorragiques parfois compliquées de syndrome hémolytique et urémique (SHU),
- les ETEC pour « Enterotoxigenic *E. coli* », responsables de diarrhées aqueuses (« turista »),
- les EIEC pour « Enteroinvasive *E. coli* », entraînant un syndrome dysentérique proche de celui des *Shigella* spp.,
- les EAEC pour « Enteroaggregative *E. coli* », responsables de diarrhées persistantes,
- les DAEC pour « Diffusely adherent *E. coli* », entraînant également des diarrhées aqueuses persistantes.

Le site de l'adhésion dans le tractus intestinal diffère en fonction des souches (Figure 13) (143). Chaque pathotype possède un mécanisme de pathogénicité (adhésion, invasion, production d'entérotoxines) qui lui est propre et engendre un syndrome spécifique (143).

2.4.2 Les *Escherichia coli* pathogènes extra-intestinaux

Le terme de ExPEC (pour « Extra-intestinal pathogenic *E. coli* ») regroupe les pathovars responsables d'infections extra-intestinales (145) : les UPEC (pour « Uropathogenic *E. coli* ») et les MNEC (pour « Meningitis-associated *E. coli* ») (Figure 13).

2.4.2.1 UPEC

Les UPEC sont les principales étiologies des infections du tractus urinaire, à la fois en milieu communautaire et en milieu hospitalier. Ils sont responsables de 75% des infections urinaires simples et 65% des infections urinaires compliqués (obstruction des voies urinaires, immunodépression, rétention d'urines causée par une maladie neurologique, grossesse, présence d'une sonde à demeure, exposition récente aux antibiotiques) (8).

▪ Facteurs de virulence

De nombreux facteurs de virulence membranaires (adhésines, polysaccharides de surface, capsule) ou sécrétés (toxines, sidérophores, protéases, invasines, hémolysines, ...) ont été identifiés chez les UPEC (Tableau 2) (146). Certains facteurs de virulence (*pili* de type 1, *pili* de type P, cytotoxine CNF1, alpha-hémolysine) apparaissent comme particulièrement impliqués dans la physiopathogénèse des infections urinaires mais leur prévalence varie selon les souches. Les gènes de virulence acquis par les UPEC sont regroupés dans des îlots de pathogénicité (PAIs, « Pathogenicity Associated Islands ») intégrés au chromosome bactérien et dont le contenu en G+C diffère par rapport au contenu moyen du reste du génome. Huit PAIs ont été particulièrement décrits chez les UPEC : PAI I₅₃₆, PAI II₅₃₆, PAI III₅₃₆, PAI IV₅₃₆, PAI I_{J96}, PAI II_{J96}, PAI I_{CFT073} et PAI II_{CFT073} (147). Plus rarement, les gènes de virulence peuvent être portés par des plasmides (148).

Category/gene(s)*	CFT073	536	UTI89	ABU 83972	APEC-01
Serotype	O6:K2: H1	O6: K15: H31	O18: K1:H7	OR: K5:H-	O1:K1: H7
Iron acquisition systems					
<i>ent</i> (enterobactin siderophore)	+	+	+	+	+
<i>iro</i> (salmochelin siderophore)	+	+	+	+	+
<i>chu</i> (hemin uptake system)	+	+	+	+	+
<i>Sit</i> (iron/manganese transport)	+	-	+	+	+
<i>iutA</i> (aerobactin siderophore)	+	-	-	+	+
<i>fyuA</i> (yersiniabactin siderophore)	+/nf	+	+	+	+
Pili					
<i>fim</i> (type 1)	+	+	+	+/nf	+
<i>pap</i> (P)	++	+	+	+/nf	+
<i>sfa</i> (S)	+	+	+	-	-
<i>foc</i> (F1C)	+	+	-	+/nf	-
Toxins					
<i>hly</i> (α -hemolysin)	+	++	+	+/nf	-
<i>CNF1</i> (cytotoxic necrotizing factor 1)	-	-	+	+ [†]	-
<i>vat</i> (vacuolating autotransporter toxin)	+	+	+	?	+
<i>sat</i> (secreted autotransporter toxin)	+	-	-	?	-

Tableau 2. Principaux facteurs de virulence identifiés chez les ExPEC (146).

CFT073 et 536 : souches de référence responsables de pyélonéphrites aiguës, UTI89 : souche de référence responsable de cystite, ABU83972 : souche de référence isolée dans le cadre d'une bactériurie asymptomatique, APEC-01 : souche de référence aviaire. nf : présence du facteur de virulence non fonctionnel, ? : présence non déterminée, † : fonctionnalité inconnue.

■ Physiopathologie des infections à UPEC

Les UPEC colonisent le tube digestif puis atteignent par voie ascendante le tractus urogénital. La colonisation du tractus urinaire fait intervenir l'adhésion des bactéries aux cellules urothéliales grâce à l'interaction des *pili* de type 1 portant l'adhésine FimH avec différents récepteurs comme les uroplakines I et IIIa ou les intégrines $\alpha 3$ et $\beta 1$ (Figures 14A et 15A) (8, 149). D'autres fimbriae (*pili* de type P, F1C, S, Afa), les *curli* (fibres amyloïdes) ainsi que des autotransporteurs ont un rôle dans l'adhésion (Figure 15B). Cette interaction conduit à l'internalisation des bactéries dans les cellules en ombrelle de la couche apicale de l'épithélium vésical par un mécanisme « zipper » dépendant du trafic cellulaire. On considère que 12 heures après le début d'une cystite, environ 50% des UPEC sont internalisés et ainsi protégés du système immunitaire et des antibiotiques (150, 151). Certains UPEC internalisés déjouent le système immunitaire inné et échappent à la dégradation lysosomale pour former,

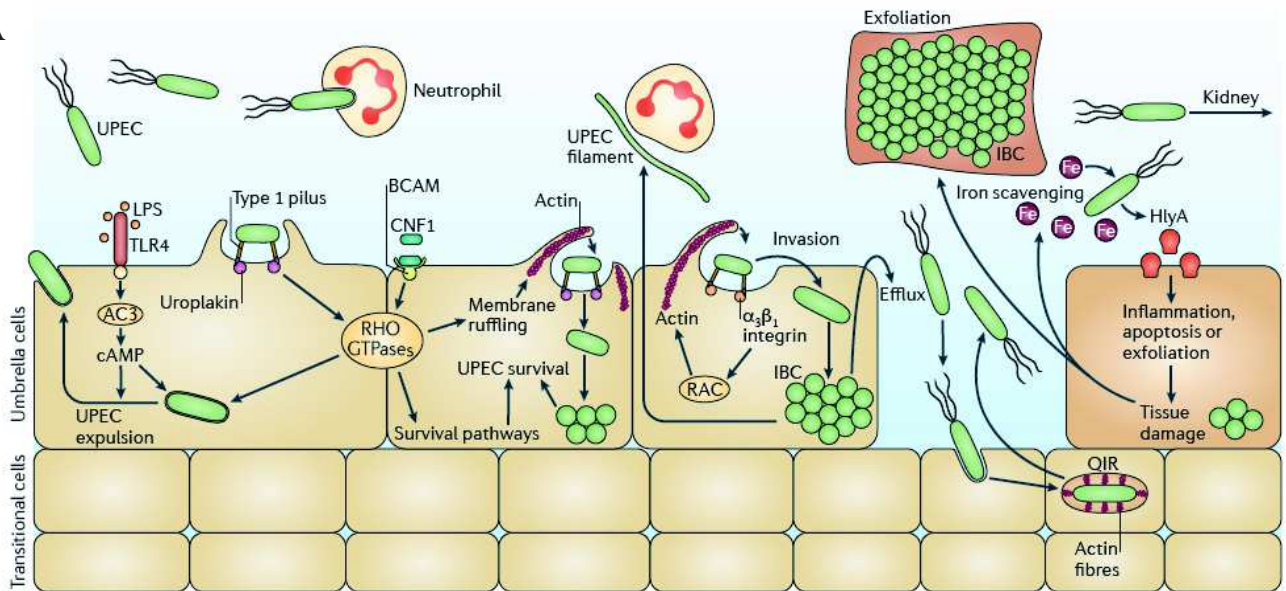
dans le cytoplasme des cellules infectées, des agglomérats dénommés : Communautés Bactériennes Intracellulaires (IBCs) (Figure 16) (8, 151, 152). La maturation des IBCs s'accompagnent d'un changement de morphologie de la bactérie : d'abord cocoïdes, puis en forme de bâtonnets, les UPEC s'échappent dans la lumière vésicale pour infecter de nouvelles cellules sous une forme filamenteuse qui les rend plus résistantes à l'action des polynucléaires neutrophiles (PNN) (Figure 17) (152). La fragilisation de la couche cellulaire superficielle et la maturation des IBCs permettent la pénétration des UPEC dans les cellules basales sous-jacentes. Certaines bactéries peuvent établir des réservoirs intracellulaires quiescents (QIRs) qui sont constitués de bactéries non répliquatives pouvant persister plusieurs mois dans un compartiment intracellulaire entouré d'actine F (Figures 14A et 17) (8). Les QIRs expliquent le caractère récurrent de certaines infections urinaires : les épisodes récurrents font suite au renouvellement de l'urothélium et à la différenciation des cellules basales en cellules apicales exfoliées dans la lumière vésicale (153).

En outre, les UPEC survivent dans l'environnement hostile de la vessie en sécrétant plusieurs facteurs nécessaires à l'acquisition de nutriments. Le facteur cytotoxique nécrosant (CNF1), par activation des Rho GTPases intracellulaires RAC1 et RHOA, induit l'apoptose des cellules urothéliales. L' α -hémolysine (HlyA) favorise la lyse de la cellule hôte par la formation de pores et facilite l'acquisition de nutriments et la libération du fer. Les sidérophores exprimées par les UPEC (aérobactine IutA, entérobactine EntB, yersiniabactine FyuA et Irp, salmochélines IroN) et les récepteurs de l'hème (ChuA et Hma) permettent de piéger le fer et favorisent la survie des UPEC. HlyA déclenche également une exfoliation épithéliale qui permet l'invasion des cellules de la couche profonde dans lesquelles se forment les QIRs (8).

La colonisation des reins est dépendante de l'expression des *pili* de type P (« pyelonephritis-associated *pili* ») (Figures 14B et 15B). La lectine PapG, située à l'extrémité des *pili* de type P, permet aux bactéries de s'ancrer aux motifs galabiose des glycosphingolipides exprimés par les cellules tubulaires rénales (149). PapG interagit également avec TLR4 pour réduire l'expression du récepteur d'immunoglobuline polymérique (PIGR) et prévenir l'opsonisation des UPEC par les IgA (Figure 14B) (8).

Les UPEC peuvent alors franchir la barrière du tubule rénal et disséminer dans le sang, soit par un mécanisme de translocation bactérienne au travers de l'épithélium intact, soit en altérant l'intégrité de l'épithélium tubulaire rénal (154).

A



B

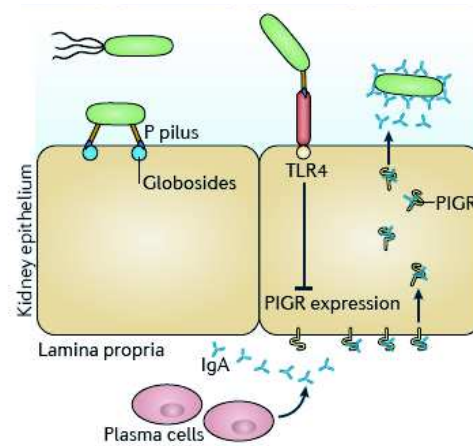


Figure 14. Facteurs de virulence impliqués dans la pathogénicité des UPEC aux niveaux vésical (A) et rénal (B) .

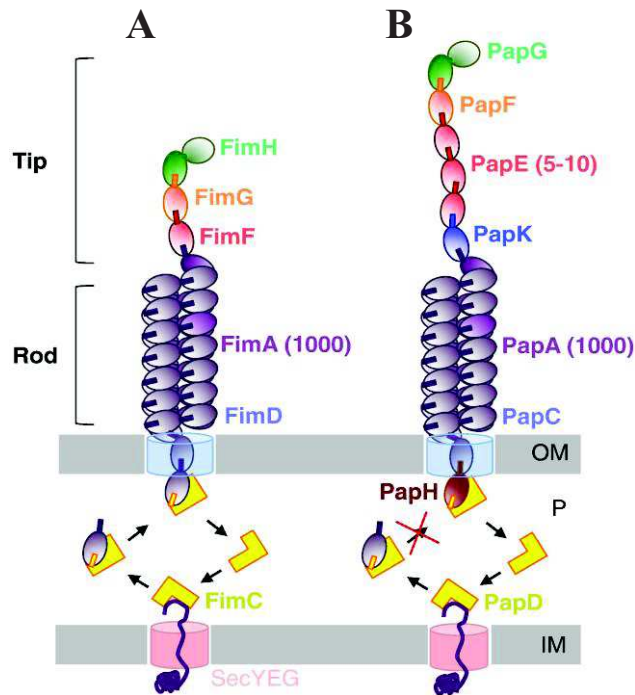


Figure 15. Représentation schématique de la structure des *pili* de type 1 (A) et des *pili* de type P (B) chez les UPEC (149).

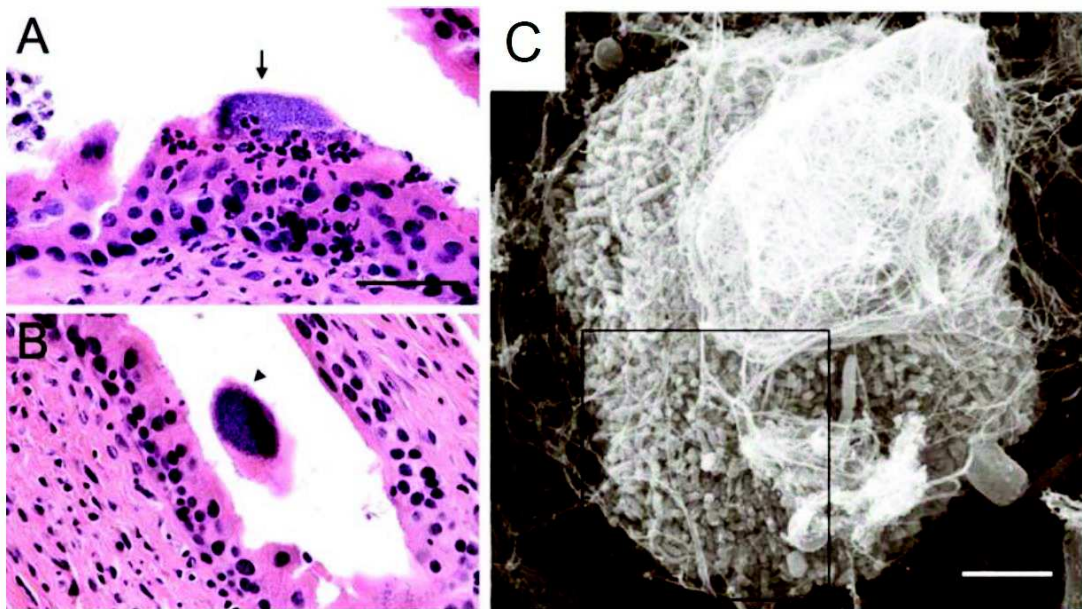


Figure 16. Communauté intracellulaire bactérienne (IBC) au cours d'une cystite aigue (151).

(A) Formation d'une IBC dans les cellules en ombrelle de la couche apicale de l'épithélium vésical ou (B) exfoliée dans la lumière vésicale. (C) IBC en microscopie électronique à balayage (échelle : 5 μ m).

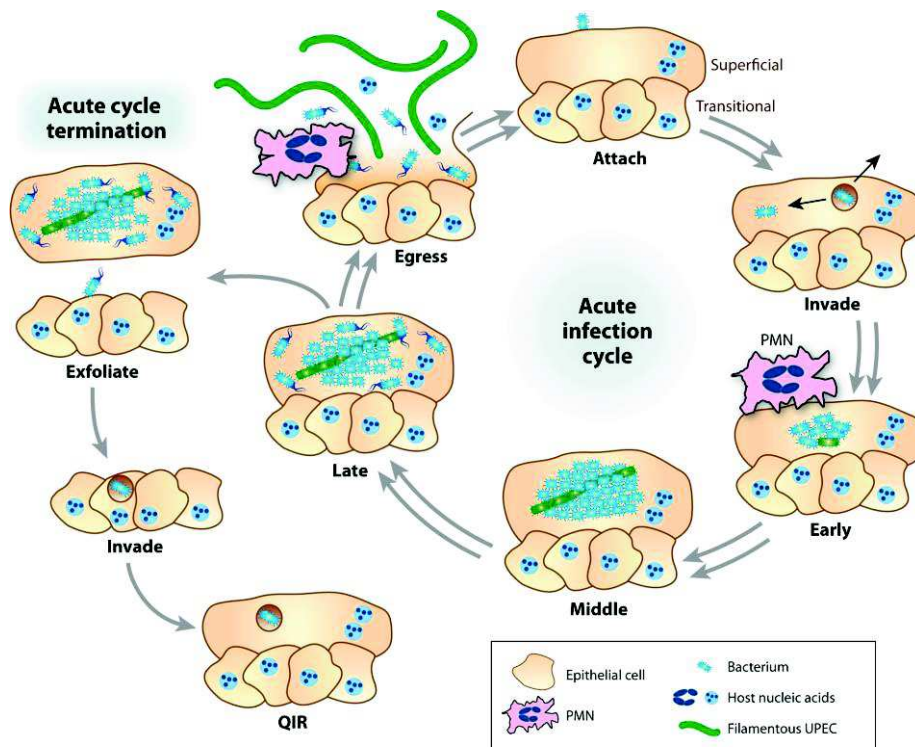


Figure 17. Représentation schématique du cycle de vie intracellulaire des UPEC (152).

2.4.2.2 MNEC

Les MNEC sont responsables de 80 % des cas de méningites néonatales. Ils sont protégés du système immunitaire de l'hôte par une capsule de type K1. Le processus infectieux se fait en plusieurs étapes qui vont de la colonisation à l'invasion des muqueuses jusqu'à la traversée de la barrière hémato-méningée (155). Les mécanismes d'adhésion des MNEC font intervenir les *pili* de type 1 et la protéine OmpA qui reconnaissent respectivement les récepteurs CD48 et Gp96 à la surface luminale de l'endothélium cérébral. L'invasion met en jeu l'invasine IbeA et la cytotoxine CNF1 qui se lie au récepteur laminine de 67 kDa (67LR). L'internalisation des bactéries permet le passage de la barrière hémato-méningée afin d'atteindre le système nerveux central (155).

2.4.3 Plasticité du génome

La variabilité phénotypique observée au sein de l'espèce *E. coli* reflète une grande plasticité génomique. En effet, les *E. coli* pathogènes possèdent jusqu'à 20% d'information génétique supplémentaire, comparativement aux souches commensales. Ainsi, le génome complet de la

souche uropathogène de référence CFT073 est constitué de 5 231 428 paires de bases (pb) contre 4 641 652 pb pour la souche commensale *E. coli* K-12 (156).

L'analyse comparative de génomes complets a mis en évidence l'existence de deux fonds génétiques principaux au sein du pangénome de *E. coli* : le core génome (génome cœur) identique chez toutes les souches de l'espèce, et le génome accessoire regroupant un répertoire de gènes inconstamment présents qui ne cesse d'augmenter avec les différents génomes disponibles (Figure 18) (140).

Des échanges horizontaux d'éléments génétiques mobiles portés par des plasmides, des transposons, des bactériophages ou des PAIs permettent l'acquisition de facteurs de virulence, de survie ou de compétition dans un environnement donné (Figure 19) (157). La plupart des gènes de virulence acquis par les ExPEC sont regroupés sur des PAIs intégrés au chromosome bactérien. Par exemple, la souche uropathogène CFT073 possède 13 PAIs importants pour son fitness et sa virulence (158).

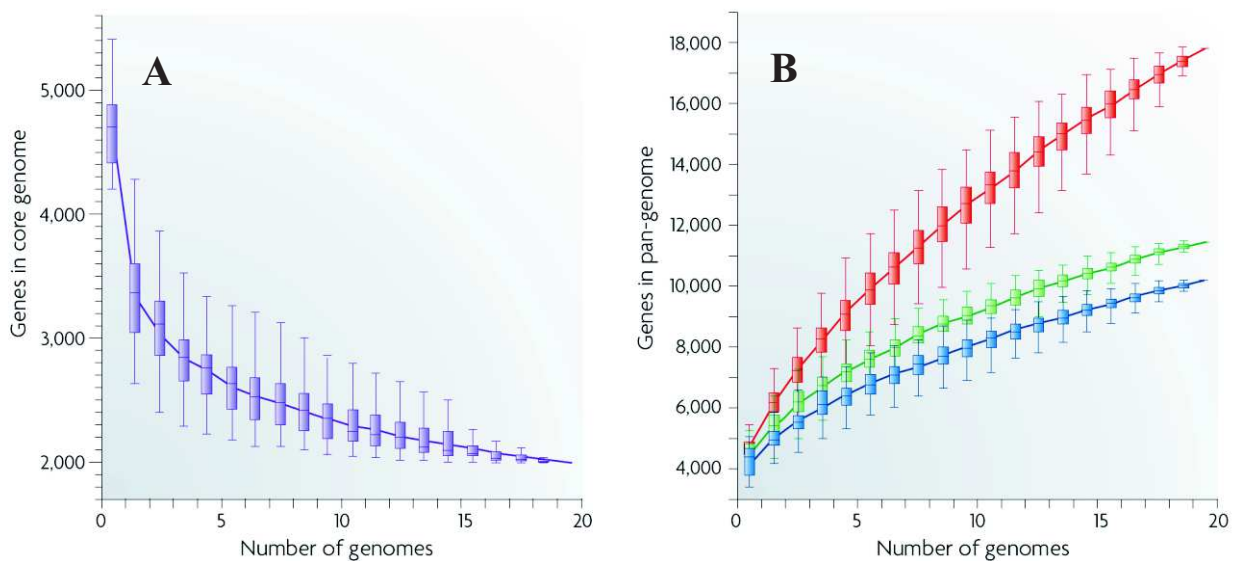


Figure 18. Evolution du core génome (A) et du pangénome (B) de *E. coli* en fonction du nombre de génomes séquencés disponibles (140).

Après l'analyse des séquences de 20 génomes, le core génome (A, courbe violette) comprend 1 976 gènes (11% du pangénome). Le pangénome comprend 17 838 gènes (B, courbe rouge) dont 11 432 gènes n'ont pas d'homologie (moins de 80% de similarité de séquences) (B, courbe verte). Après avoir éliminé les séquences d'insertions et les éléments correspondant à des prophages, le pangénome de *E. coli* compte 10 131 gènes (B, courbe bleue).

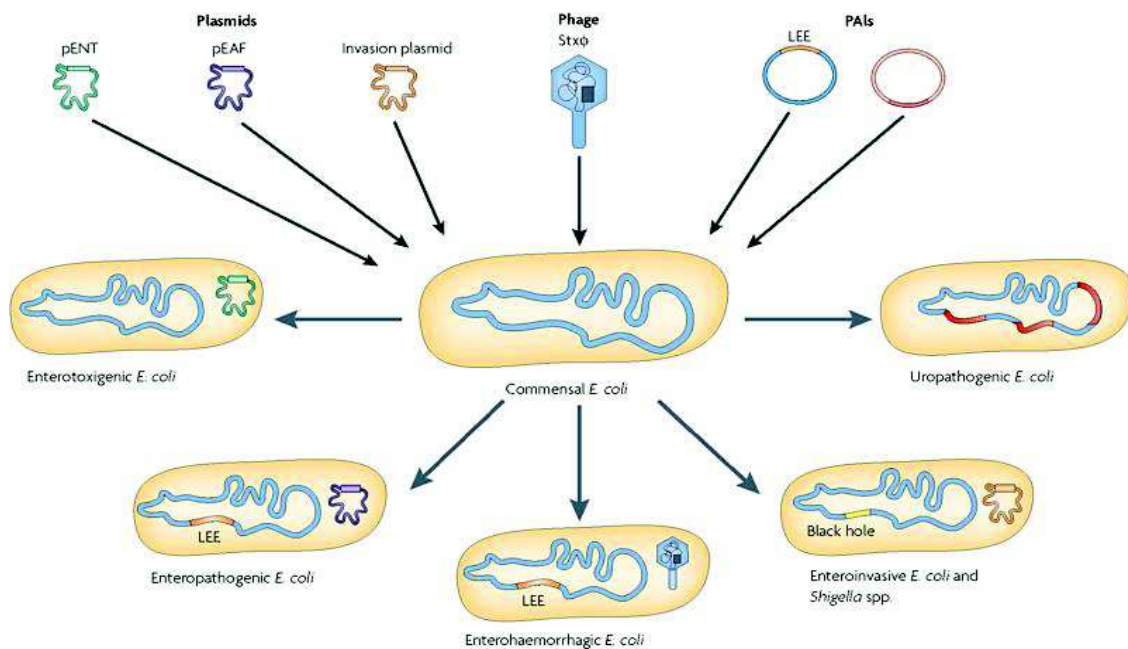


Figure 19. Transferts horizontaux de matériel génétique chez *E. coli* (157).

pENT, enterotoxin-encoding plasmid; pEAF, enteropathogenic adhesion-factor plasmid; Stx, Shiga-toxin-encoding bacteriophage; PAIs, Pathogenicity Islands; LEE, locus of enterocyte effacement.

2.5 Typage des *Escherichia coli*

2.5.1 Sérogroupage et sérotypage

Une des plus anciennes classifications de *E. coli* est fondée sur les travaux de Kauffman en 1947 (159) et se base sur la détermination :

- du séroroupe, identifié selon l'antigène somatique O (partie terminale du lipopolysaccharide, LPS),
- du sérotype, identifié au sein du séroroupe sur la base des antigènes H flagellaires et éventuellement des antigènes K de la capsule.

La combinaison de ces antigènes de surface permet de sérotyper les souches par agglutination à l'aide de sérums spécifiques. 184 sérogroupes, 56 antigènes H et 80 antigènes K sont actuellement connus (160, 161).

2.5.2 Electrophorèse en champ pulsé

Cette technique de référence, qui repose sur l'analyse de fragments d'ADN génomique obtenus à l'aide d'une enzyme de restriction à sites de coupure rares, a été proposée pour le

typage des souches de *E. coli* (162, 163). Les profils de restriction obtenus pour chaque souche, ou pulsotypes, sont comparés entre eux. L'électrophorèse en champ pulsé (« Pulsed Field Gel Electrophoresis », PFGE) est une méthode reproductible, très discriminante et facile à interpréter grâce aux critères de Tenover (164). Elle constitue la base de systèmes de surveillance nationaux et internationaux, tels que le PulseNet aux Etats-Unis et le PulseNet international (<http://www.cdc.gov/pulsenet/>). Cependant, sa réalisation délicate et relativement longue en limite l'usage.

2.5.3 Phylotypage

Dès les années 2000, une méthode simple et rapide basée sur une PCR triplex (détection des gènes *chuA*, *yjaA* et du fragment d'ADN TSPE4.C2) est proposée par Clermont et coll. (165). Les souches de *E. coli* sont ainsi catégorisées en 4 groupes phylogénétiques majeurs :

- A et B1 rassemblant une majorité des InPEC et des souches commensales,
- B2 et D regroupant les ExPEC.

Cette méthode de phylotypage largement utilisée ne permet pas de classer 15 à 20% des *E. coli* (166). Depuis 2013, une évolution de cette méthode (détection supplémentaire de *arpA* et *trpA*) permet de caractériser les souches en 7 phylogroupes appartenant à *E. coli stricto sensu* (A, B1, B2, C, D, E, F) et un phylogroupe correspondant à *E. coli* clade 1 (166).

2.5.4 Multi-Locus Sequence Typing (MLST)

Depuis la fin des années 90, la technique de MLST est reconnue comme une puissante méthode pour l'étude génétique des populations bactériennes (167). Elle correspond à l'amplification et au séquençage de plusieurs gènes dits « de ménage », dont la séquence comporte des fragments hautement conservés au sein de l'espèce et des fragments variables. Les séquences obtenues sont comparées avec une banque d'allèles établie au préalable, afin de déterminer le profil allélique unique ou « Sequence Type » (ST) de chaque souche. Les avantages de cette technique sont la bonne reproductibilité et la possibilité de comparer les souches entre les laboratoires.

Il existe deux schémas de MLST pour *E. coli*. Le premier, défini par Achtman, se base sur le séquençage de 7 gènes : *adk* (adénylate kinase), *fumC* (fumarate hydratase), *gyrB* (sous-unité B de l'ADN gyrase), *icd* (isocitrate/isopropylmalate déshydrogénase), *mdh* (malate déshydrogénase), *purA* (adénylosuccinate déshydrogénase) et *recA* (ATP/GTP binding motif) (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>) (168). Le second, élaboré par l'Institut Pasteur, se

base sur le séquençage de 8 gènes de ménage : *dinB* (DNA polymérase), *icdA* (isocitrate déshydrogénase), *pabB* (*p*-aminobenzoate synthase), *polB* (polymérase PolII), *putP* (proline perméase), *trpA* (sous-unité A de la tryptophane synthase), *trpB* (sous-unité B de la tryptophane synthase), *uidA* (β -glucuronidase) (<http://bigsdbs.web.pasteur.fr/ecoli/ecoli.html>) (169). Cette méthode est couramment appliquée pour génotyper les souches de *E. coli* et les regrouper au sein de complexes clonaux (CC). Elle a permis d'observer l'émergence de lignées clonales (Figure 20) (170). Parmi les ExPEC, 5 lignées sont particulièrement associées aux infections du tractus urinaire et aux bactériémies, à la fois dans les milieux communautaire et hospitalier : ST131, ST393, ST69, ST95, et ST73 (171).

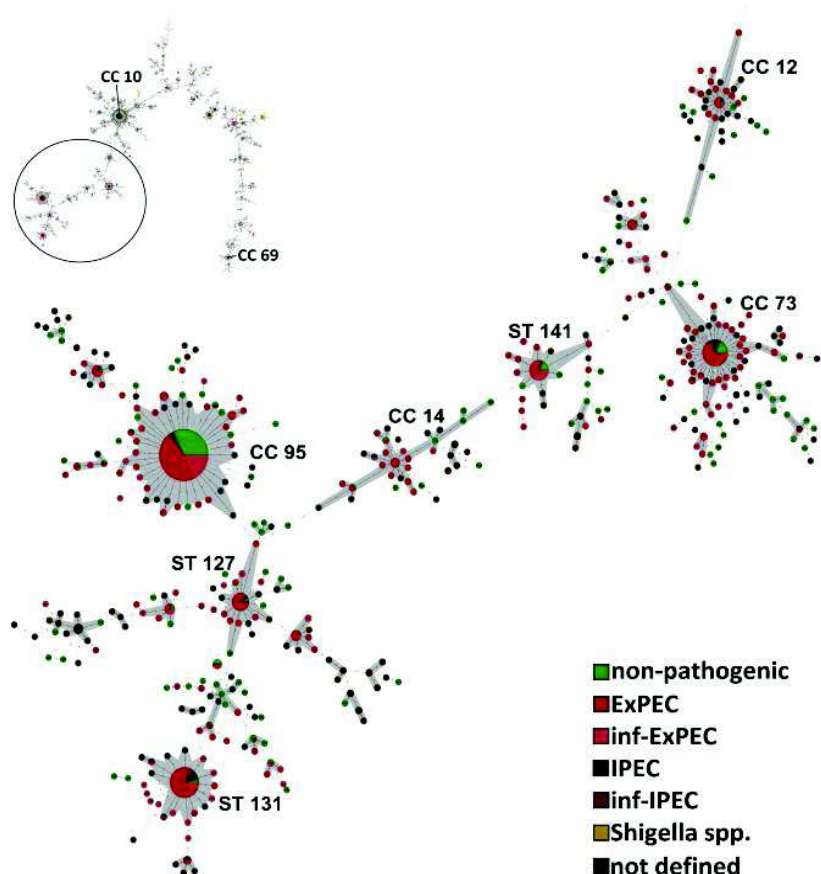


Figure 20. Fond phylogénétique des ExPEC, InPEC et des *E. coli* non pathogènes d'après les données MLST du système d'Achtman (logiciel Seqsphere, Ridom GmbH) (170). La partie de l'arbre comprenant les CC dominés par les ExPEC a été élargie. La taille du camembert reflète le nombre de souches alloué aux différents ST et CC.
ExPEC, *E. coli* pathogènes extra-intestinaux confirmés ; inf-ExPEC, *E. coli* pathogènes extra-intestinaux déduits ; IPEC, *E. coli* pathogènes intestinaux confirmés ; inf-IPEC, *E. coli* pathogènes intestinaux déduits.

2.5.5 Typage de l'allèle *fimH*

La plupart des *E. coli* possède le gène *fimH* codant pour la sous-unité mineure des *pili* de type 1 responsable de l'adhésion aux cellules épithéliales de l'hôte (172). Ce gène présente une diversité allélique très importante (173, 174). Le *fimH* Typing Region (*fimH*_{TR}) permet, en association ou non avec le phylotypage, une discrimination puissante entre les isolats de *E. coli* (175).

Le CH Typing (CHT), ou clonotyping, étudie à la fois les SNPs (« single nucleotide polymorphisms ») de *fimH* et ceux du gène de ménage *fimC*. C'est un outil puissant de comparaison des ExPEC dont le pouvoir discriminant est comparable, voire supérieur, à la technique de MLST (176) (Figure 21).

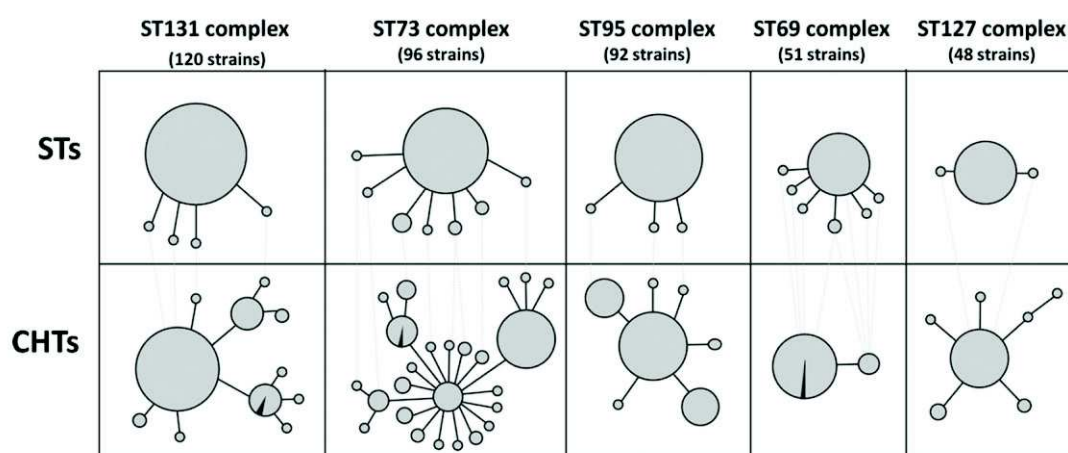


Figure 21. Correspondance entre les STs et les CHTs pour les 5 plus grands complexes clonaux de *E. coli* (176).

Les lignes grises relient les STs mineurs avec leurs CHTs correspondants. Les CHTs restants correspondent aux STs prédominants au sein du complexe. Les CHTs représentés par des cercles entiers s'apparient exactement aux complexes clonaux (100% d'appariement). Les cercles avec une « tranche » représentent les CHTs qui ne s'apparient pas totalement avec les complexes clonaux (92-97% d'appariement, la « tranche » représentant le non appariement).

2.5.6 Séquençage génomique

L'apparition des techniques de séquençage de dernière génération a permis un développement spectaculaire de la génomique ces dix dernières années (177). Les analyses de génomes entiers bactériens devraient bientôt se positionner comme de nouveaux outils diagnostiques. Devenues techniquement et financièrement abordables, elles offrent des perspectives intéressantes pour typer plus précisément les souches. Actuellement, plus de 2800 génomes de *E. coli* ont été déposés dans GenBank (178).

3 *Escherichia coli* ST131

En 2008, 36 isolats cliniques de *E. coli* appartenant à un même groupe clonal jusqu'alors inconnu, le ST131, ont été identifiés dans 8 pays sur 3 continents (11). Il a été montré depuis que les ST131 sont à l'origine de la majorité des infections à *E. coli* MDR et regroupent de multiples sous-clones (12, 179).

3.1 Caractères bactériologiques

3.1.1 Phylotype et sérotypes

Les *E. coli* ST131 appartiennent au phylogroupe B2 (11). Parmi les 9 sous-groupes constituant le phylogroupe B2, ils se placent au sein du sous-groupe I qui constitue la base de ce phylogroupe, témoignant d'une divergence ancienne en comparaison avec les autres *E. coli* B2 non ST131 (180, 181).

Les *E. coli* ST131 sont principalement de sérotype O25b:H4 (11). Un deuxième sérotype moins fréquent, O16:H5, a été rapporté dans plusieurs pays : Danemark, Espagne, France, Japon, Etats-Unis, Pakistan et Australie (182–188). Le séro groupe O157 et l'expression d'antigènes somatiques O non typables ont également été décrits (183, 185, 188).

3.1.2 Facteurs de virulence et virotypes

De nombreuses études se sont intéressées aux facteurs de virulence exprimés par les *E. coli* ST131 (11, 12, 189, 190). Les premières études ont montré l'absence de deux gènes de virulence classiques des UPEC : *papG* codant pour l'adhésine des *pili* de type P et *cnf1* codant pour une toxine nécrosante. Toutefois, les *E. coli* ST131 appartiennent aux ExPEC puisqu'ils expriment 2 des 5 gènes de virulence définissant ce groupe : *kpsMIII* codant pour une protéine de transport impliquée dans la synthèse de la capsule du groupe 2 et *iutA* codant pour un récepteur de l'aérobactine (191). Neuf autres gènes sont fréquemment détectés chez ce clone (179) :

- *sat* : codant pour une toxine sécrétée,
- *fimH* : codant pour l'adhésine des *fimbriae* de type 1,
- *fyuA* : codant pour un récepteur de la yersiniabactine,
- *usp* : codant pour une protéine uropathogène spécifique des UPEC,

- *malX* : un marqueur de PAI détecté chez les UPEC,
- *iha* : codant pour une protéine impliquée dans la capture des sidérophores et l'adhésion,
- *ompT* : codant pour une peptidase de la membrane externe,
- *iucD* : codant pour l'aérobactine,
- *traT* : codant pour une protéine de la membrane externe associée à une résistance au système du complément du sérum.

L'équipe du centre national de référence espagnol des *E. coli* a récemment proposé une classification des ST131 en cinq profils de virulence majeurs, ou virotypes, en fonction de la détection de onze gènes par PCR (183, 190, 192) (Tableau 3). Le virotype D est lui-même divisé en 5 sous-virotypes. Le virotype C semble être le plus répandu (190). Les premières souches de *E. coli* ST131 isolées mondialement en 2008 appartiennent au virotype C, tout comme les souches de sérotypes O16:H5 (179, 192).

Virotype	Virulence factor-encoding gene status ^b										
	<i>afa/draBC</i>	<i>afa</i> operon	<i>iroN</i>	<i>sat</i>	<i>ibeA</i>	<i>papGII</i>	<i>cnf1</i>	<i>hlyA</i>	<i>papGIII</i>	<i>cdtB</i>	<i>neuC-K1</i>
A	+	+	–	+/- ^c	–	–	–	–	–	–	–
B	–	–	+	+/- ^c	–	–	–	–	–	–	–
C	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–
D	+/-	+/-	+/-	+/-	+	–	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
E	–	–	–	+	–	+	+	+	–	–	–

Tableau 3. Virotypes de *E. coli* ST131 selon l'expression de 11 gènes de virulence (179).

^b *afa/draBC*, adhésine Afa/Dr; *afa* operon, « afimbrial-adhesin-encoding » operon FM955459; *iroN*, récepteur de sidérophores de type catechol; *sat*, « secreted autotransporter toxin »; *ibeA*, « invasion of brain endothelium »; *papGII*, allèle II du gène *papG*; *cnf1*, « cytotoxic necrotizing factor type 1 »; *hlyA*, alpha-hémolysine; *papGIII*, allèle III du gène *papG*; *cdtB*, « cytolethal distending toxin »; *neuC-K1*, variant K1 du groupe II capsulaire.

^c La majorité des isolats de virotypes A et B possèdent le gène *sat*.

3.1.3 Typage des sous-clones de *E. coli* ST131

3.1.3.1 Pasteur Sequence Types (PSTs)

Le ST131 a été défini par le système d'Achtman basé sur l'analyse des séquences de 7 gènes de ménage. Le schéma de l'Institut Pasteur, qui s'appuie sur les séquences de 8 gènes de

ménage, a permis d'identifier plusieurs PSTs correspondant à différentes lignées du ST131 (185, 192):

- PST9, 43, 527, 568, 621 parmi le séro groupe O25b,
- PST506, 566, 567, 625 parmi le séro groupe O16.

3.1.3.2 Pulsotypes

L'électrophorèse en champ pulsé est très discriminante au sein du groupe clonal ST131. A partir d'une collection de 579 *E. coli* ST131 de diverses origines (humaine, animale, environnementale) isolés entre 1967 et 2009, Johnson et coll. ont identifié 170 pulsotypes, dont 65 regroupaient plusieurs isolats (162). Comme cela avait été montré en 2008, un même pulsotype pouvait comprendre des souches aux origines géographiques lointaines (11). En revanche, dans la majorité des cas, un pulsotype était associé à un seul réservoir, témoignant d'une faible transmission entre les sources humaines, environnementales et animales. Trois paramètres caractérisaient les pulsotypes les plus répandus : la résistance aux antibiotiques, le réservoir humain et une date d'isolement récente. Un pulsotype dominant, désigné « 968 », regroupait 136 souches et était spécifiquement associé à la résistance aux fluoroquinolones.

3.1.3.3 *fimH* type

L'application du *fimH*_{TR} au clone ST131 a permis d'identifier, à ce jour, 7 sous-clones du ST131. Dans une collection de 352 souches isolées dans différentes régions du monde entre 1967 et 2011, Johnson et coll. ont évalué la prévalence de chacun d'entre eux. Le sous-clone *H30* était le plus fréquent (n=236, 67%), suivi de *H22* (n=73, 21%), *H35* (n=19, 5%), *H41* (n=19, 5%), *H27* (n=3, 1%), *H15* et *H94* (n=1, 0.3%) (193). Le *fimH*_{TR} était en accord avec le typage par PFGE : chaque sous-clone correspondait à une région précise du dendrogramme obtenu à partir de l'analyse des pulsotypes des souches. Le sous-clone dominant *H30* regroupait principalement des souches isolées à partir des années 2000 résistantes aux fluoroquinolones. Cette résistance était le résultat d'une combinaison spécifique des sous-unités A des topoisomérases de type I et II : GyrA_{S83L+D87N} / ParC_{S80I+E84V}.

L'analyse phylogénomique de 105 souches de *E. coli* ST131 ont permis à Price et coll. de démontrer que l'acquisition de l'allèle 30 de *fimH* était antérieure à celle des mutations des topoisomérases (13). Le sous-clone en pleine expansion qui regroupait la majorité des isolats résistants aux fluoroquinolones a été dénommé *H30-R* (Résistant) (Figure 22). Au sein du

sous clone *H30-R*, l'analyse phylogénomique a également montré que 91 % des isolats qui exprimaient le gène *bla*_{CTX-M-15} dérivait d'un ancêtre commun et appartenait à un seul clade bien différencié. Ce clade a été désigné *H30-R_x* en raison de sa résistance « *extensive* » (Figure 22). Ces résultats montrent que la dissémination des enzymes CTX-M-15 et de la résistance aux fluoroquinolones chez *E. coli* ST131 sont le résultat d'une expansion clonale (13).

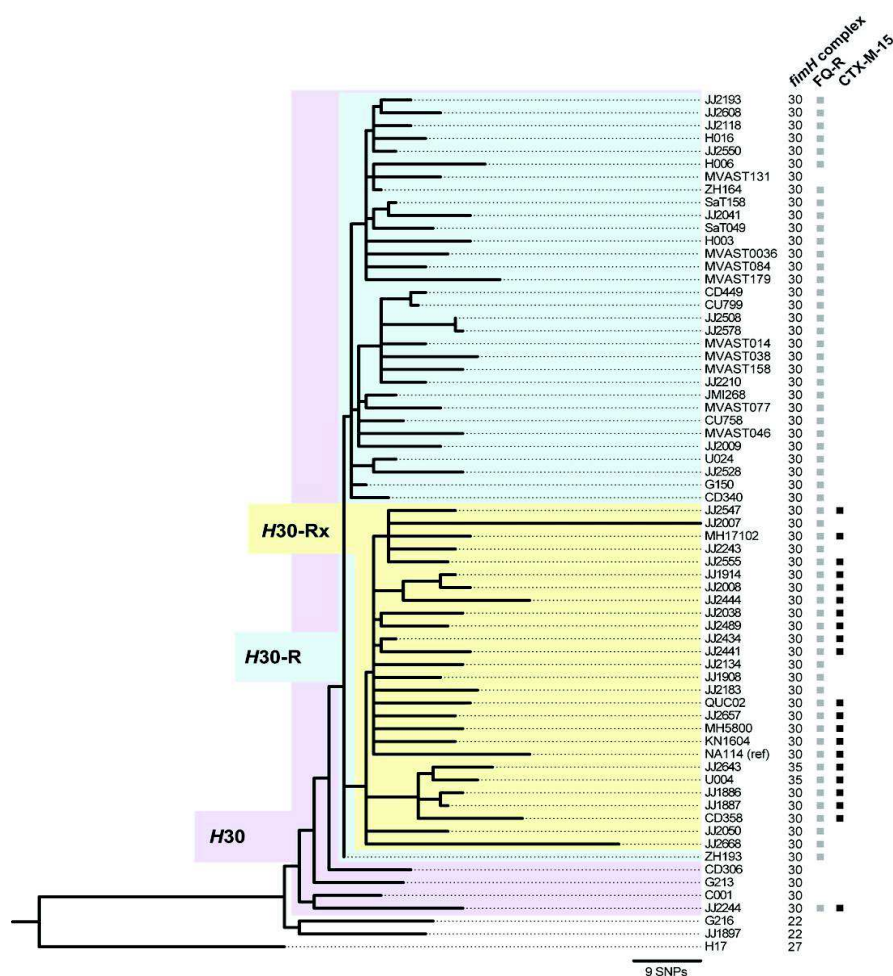


Figure 22. Analyse phylogénomique de l'émergence de la résistance aux fluoroquinolones et de la production de BLSE CTX-M-15 au sein du clone ST131 (13).

Environ 51,8% du génome de la souche de référence NA114 (ST131 isolé en Inde) était partagé entre tous les isolats. L'arbre phylogénétique présenté a été construit à partir de l'analyse des régions génomiques partagées entre les isolats (72 SNPs informatifs parmi 771 SNPs). Les 3 blocs de couleurs imbriqués mettent en évidence les 3 sous-clones du ST131 : *H30* (violet), *H30-R* (bleu), *H30-R_x* (jaune).

3.1.4 Méthodes de screening des *E. coli* ST131

3.1.4.1 Méthodes basées sur l'analyse de SNPs spécifiques

Ces techniques de dépistage s'appuient sur la diversité génétique observée au sein de l'espèce *E. coli*. Dès lors qu'un isolat est identifié comme faisant partie du groupe phylogénétique B2 (165, 166), plusieurs méthodes peuvent être appliquées et renseigner rapidement sur l'appartenance de la souche au ST131 et/ou à un de ses sous-clones:

- la détection du séro groupe O25b par amplification spécifique de la partie 5' du locus *rfb* (194),
- la détection des SNPs de l'allèle *pabB* détectés chez les *E. coli* ST131 par PCR spécifique (181),
- l'amplification et le séquençage de deux gènes de ménage du système d'Achtman : *gyrB* et *mdh* (195),
- la technique de PCR multiplex développée par Blanco et coll. ciblant l'allèle *rfb*-O25b, la partie 3' terminale du gène *bla*CTX-M-15 et le gène de virulence *afa/draBC* caractéristique du virotype A. Une autre PCR multiplex développée par les mêmes auteurs permet de détecter les virotypes B, C et D (190).
- le CH clonotyping (amplification et séquençage des gènes *fumC* et *fimH*) qui permet de dépister le sous-clone ST131-*H30* (clonotype 40-30) (176, 196). Cette méthode particulièrement puissante permet de distinguer les isolats de séro groupe O25b (*H30*) des isolats de séro groupe O16 (*H41*). Elle a été employée avec succès directement sur les échantillons urinaires (197).
- la nouvelle technique de PCR multiplex développée par Johnson et coll. qui permet de différencier les séro groupes O25b et O16 en ciblant le variant *rfb*O16 et les allèles spécifiques de *mdh* et *gyrB* (186).

3.1.4.2 Spectrométrie de masse

Parallèlement aux méthodes de typage par PCR \pm séquençage, la technologie MALDI-TOF (« Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry ») est actuellement reconnue comme un outil d'intérêt dans le dépistage de certains clones (198). Quatre études ont, à ce jour, évalué les performances du MALDI-TOF dans le dépistage des *E. coli* ST131 (199–202). Les résultats sont très encourageants avec une sensibilité de détection de 82,5 à 100% et une spécificité de 89,7 à 100% en fonction des méthodes. L'étude

japonaise menée par Matsumura et coll. montre également la possibilité de distinguer les 2 sérogroupes O25b et O16 (201).

Le MALDI-TOF est un outil prometteur qui pourrait permettre, dans un avenir proche, la détection du clone ST131 en routine et à moindre coût.

3.2 Epidémiologie des *E. coli* ST131

3.2.1 Dissémination mondiale

Depuis sa première description en 2008 sur 3 continents (Europe, Amérique du Nord, Asie), le clone *E. coli* ST131 a été rapporté dans toutes les régions du monde, à l'exception de l'Antarctique (Figure 23) (179).



Figure 23. Dissémination mondiale des *E. coli* ST131 (179).

Les étoiles rouges représentent la description de souches productrices de BLSE, les étoiles bleues représentent la description de souches résistantes aux fluoroquinolones non productrices de BLSE.

3.2.2 Prévalence parmi les isolats cliniques humains

3.2.2.1 Prévalence parmi les *E. coli* producteurs de BLSE

Les premiers isolats du clone ST131 étaient caractérisés par la production de la BLSE CTX-M-15 (11). La majorité des études se sont basées sur cette caractéristique pour établir la prévalence du clone.

En Europe, parmi les souches cliniques productrices de BLSE isolées entre 2006 et 2011, la prévalence des *E. coli* ST131 variait de 23% (parmi un nombre d'isolats N=105) en Espagne à 66% (N=232) au Royaume-Uni (182, 203–208).

Dans les autres populations du monde, la prévalence du clone ST131 semble être également élevée. Aux Etats-Unis, en 2009-2010, 54% (N=107) des *E. coli* producteurs de BLSE étaient des *E. coli* ST131 (209). Chez les vétérans américains, la prévalence en 2010-2011 était de 64% (N=123) (210). Dans cette même étude, en considérant uniquement les isolats résistants aux fluoroquinolones, la prévalence du clone ST131 atteignait les 78% (N=236). Le sous-clone H30 représentait la quasi-totalité des isolats résistants. Au Canada et au Japon, les chiffres sont voisins de ceux observés aux Etats-Unis avec une prévalence de 50 (N=155) et 52% (N=71), respectivement (211, 212).

Des prévalences plus importantes ont été observées en ciblant certains prélèvements. En 2009, en Inde, 70% (N=23) des isolats urinaires producteurs de BLSE appartenaient au clone ST131 (213). A Calgary (Canada), la prévalence du clone ST131 au sein des *E. coli* BLSE isolés dans les bactériémies a augmenté brutalement à partir de 2007 pour atteindre les 78% (N=63) en 2010 (Figure 24) (214).

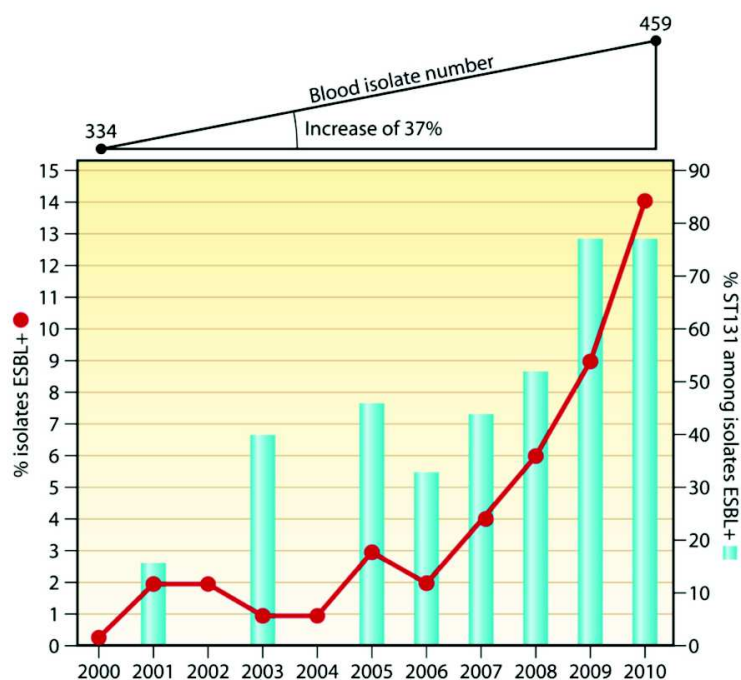


Figure 24. Evolution du pourcentage de *E. coli* producteurs de BLSE et de *E. coli* ST131 parmi les *E. coli* isolées dans les bactériémies entre 2000 et 2011 à Calgary (Canada) (179, 214).

La courbe rouge représente le pourcentage de *E. coli* BLSE et l'histogramme bleu représente le pourcentage de clone ST131 parmi ces isolats.

3.2.2.2 Prévalence parmi tous les *E. coli*

Les *E. coli* ST131 représentaient 12% des *E. coli* isolés en Espagne en 2009 (N=500) et 27% aux Etats-Unis en 2011 (N=299) (196, 215, 216). En excluant les isolats producteurs de BLSE, la prévalence était plus faible, en particulier aux Etats-Unis (13%, N=158) (216, 217). De manière globale, Banerjee et coll. ont montré que les *E. coli* ST131 prédominaient dans les infections : *i*) acquises en milieu hospitalier, *ii*) impliquant des isolats résistants, et *iii*) touchant les jeunes enfants et les personnes âgées. A l'inverse, les autres lignées d'ExPEC (ST95, ST73, ST127 et ST69) étaient plus fréquentes : *i*) chez les adolescents et les jeunes adultes, *ii*) dans les infections communautaires et *iii*) dans les infections causées par des *E. coli* sensibles aux antimicrobiens (196).

3.2.3 Prévalence parmi les isolats de la flore commensale humaine

Plusieurs études se sont intéressées au portage digestif du clone ST131 chez les sujets hébergeant des *E. coli* producteurs de BLSE. La prévalence variait selon la population

étudiée : de 10% chez les adultes sains (N=21) et les couples mère/nouveau-né (N=68) en France (2006-2011) à 46% (N=24) chez les personnes âgées vivant en maison de retraite en Allemagne (2010-2011) (218–220).

Peu d'études ont évalué la prévalence du clone ST131 parmi les *E. coli* commensaux « tout venant », qu'ils soient producteurs ou non de BLSE. En Australie, Kudinha et coll. ont estimé cette prévalence entre 0 et 4% dans 3 études conduites entre 2009 et 2011 chez des sujets sains (enfants, jeunes femmes et hommes) (221–223). En France, 7% (N=100) des sujets sains étaient colonisés par *E. coli* ST131 en 2006 et 14% (N=21) en 2011 (218, 224). Chez les patients hospitalisés dans des services de long séjour aux Etats-Unis, cette prévalence était plus élevée et atteignait 24% (N=133) (217).

Ces études suggèrent que le taux de colonisation intestinale par *E. coli* ST131 est susceptible de varier selon les caractéristiques de l'hôte, le statut BLSE et la région géographique.

3.2.4 Présence chez l'animal

3.2.4.1 Animaux de compagnie

La première description du clone chez un animal provient d'une étude portugaise publiée en 2009. Une souche de *E. coli* ST131 avait été isolée dans le cadre d'une infection du tractus urinaire chez un chien et produisait la BLSE CTX-M-15 (225). Dans une étude américaine, il a été montré qu'une même souche pouvait infecter un chien et deux chats vivant au sein du même foyer, indiquant que la transmission croisée entre les animaux de compagnie est possible (226).

Jusqu'à ce jour, la prévalence du clone n'a été évaluée chez l'animal de compagnie que parmi les souches résistantes aux céphalosporines ou aux fluoroquinolones. Une étude menée en 2008-2009 dans 8 pays européens a montré que 5,6% (N=177) des *E. coli* producteurs de BLSE isolés chez différents animaux appartenaient au ST131 (227). En Australie, 7,2% (N=125) des *E. coli* résistants aux fluoroquinolones isolés chez les chiens étaient des ST131, *versus* 35% (N=585) chez les humains (228). La prévalence sensiblement plus élevée chez l'homme que chez l'animal laisse penser que la pandémie ST131 est avant tout un phénomène humain (229).

3.2.4.2 Animaux d'élevage

Les *E. coli* ST131 semblent plus rares chez les animaux d'élevage. Leur prévalence a été

étudiée principalement chez la volaille dont la viande possède des taux élevés de contamination par *E. coli* en comparaison aux autres viandes (230). Selon les études, cette prévalence variait de 0% (N=125) en Angleterre à 2% (N=43) en Italie (231–233). Parmi les autres animaux d'élevage, *E. coli* ST131 a également été identifié chez le porc et le cheval (227, 234).

3.2.4.3 Animaux sauvages

Les animaux sauvages peuvent être un vecteur de résistance bactérienne (235). La présence du clone pandémique a été démontrée chez des mouettes (Russie, Portugal et Chili), des cormorans (Europe Centrale), des rats (Allemagne et Chine) et enfin chez des poissons (*Pagellus acarne*) de la mer Méditerranée (236–242).

3.2.5 Réservoir environnemental

Comme décrit plus haut, les *E. coli* ST131 peuvent être présents dans la microflore digestive humaine et animale. Les *E. coli* intestinaux sont libérés dans l'environnement, soit directement, soit après traitement des eaux par les stations d'épurations. De rares études ont quantifié les *E. coli* producteurs de BLSE dans les eaux usées et dans les eaux rejetées par les stations de traitement. Les données disponibles suggèrent que de grandes quantités de *E. coli* producteurs de BLSE sont présents dans les eaux usées du réseau, notamment en aval des établissements hospitaliers, et que le traitement diminue de manière significative la charge totale de *E. coli* et celle des souches résistantes (243–245). Cependant, il a été montré que les souches productrices de BLSE avaient un avantage, par rapport aux autres souches, en raison de la pression sélective exercée par les antibiotiques dans les usines de traitement (243). Malgré le traitement des eaux usées, de grandes quantités de *E. coli* producteurs de BLSE sont donc libérées dans les rivières ou dans les zones agricoles par l'intermédiaire des boues utilisées comme engrais (243, 246).

Il n'existe pas de données, à ce jour, sur la proportion relative des souches ST131 parmi la population globale des *E. coli* libérés dans l'environnement. Cependant, le clone mondial a été identifié parmi d'autres *E. coli* producteurs de BLSE dans des rivières aux environs de Barcelone, dans des sédiments sur la côte adriatique (3,5% des *E. coli* producteurs de BLSE) et dans des fleuves comme la Tamise (67% des *E. coli* résistants à la ciprofloxacine, N=30), (247–249).

3.3 Pathogénicité

3.3.1 Types d'infections engendrées et sévérité

Comme les autres ExPEC, les *E. coli* ST131 provoquent des infections extra-intestinales. Ils sont principalement à l'origine d'infections urinaires hautes et basses, communautaires ou acquises à l'hôpital, et de bactériémies (196, 214, 250, 251). Ils ont également été rapportés au cours d'infections intra-abdominales et des tissus mous, infections ostéoarticulaires, myosites, orchio-épididymites et méningites (252–256).

Il est difficile de savoir si les *E. coli* ST131 engendrent des infections plus graves que les autres ExPEC. Les données suggèrent que le clone ST131 est plus susceptible de causer des infections urinaires hautes que des infections basses (217). En Australie, il a été montré que les *E. coli* ST131 représentaient 30% des souches isolées dans des pyélonéphrites chez la femme, contre seulement 13% des isolats à l'origine des cystites (223). Cette différence était observée chez les hommes et les enfants (221, 222). La même tendance a été notée au Royaume-Uni où la prévalence des *E. coli* ST131 était de 21% dans les bactériémies comparativement à 7% parmi les isolats urinaires (257). En ce qui concerne les résultats cliniques, certaines études suggèrent que le clone ST131 tend à causer des infections urinaires persistantes ou récurrentes (258) tandis que d'autres n'ont pas trouvé de différence significative dans la sévérité des infections à *E. coli* ST131, en comparaison avec les autres ExPEC (197, 259).

3.3.2 Eléments pouvant expliquer le succès

3.3.2.1 Capacité de transmission

La capacité de transmission de *E. coli* ST131 a été démontrée parmi les membres d'une même famille (père à fille, fille à mère, sœur à sœur) et parmi les animaux de compagnie (chat, chien) vivant sous le même toit (226, 254, 260, 261). Une étude suisse a montré que la transmission était plus effective entre des personnes vivant sous le même toit qu'entre des patients « contact » au sein d'un hôpital (262). Une étude menée dans une garderie du Sud de la France a également montré que le clone ST131 pouvait disséminer chez les jeunes enfants en collectivité, avec 7 enfants colonisés par le même pulsotype (184).

Le potentiel de transmission de *E. coli* ST131, notamment entre les membres d'un même foyer, semble donc jouer un rôle essentiel dans la diffusion communautaire à grande échelle de ce clone épidémique.

3.3.2.2 Potentiel de colonisation et d'adhésion

La colonisation intestinale est considérée comme le prérequis des infections extra-intestinales engendrées par les ExPEC (263). Il est donc possible qu'une capacité de colonisation intestinale supérieure sous-tende la diffusion généralisée du clone ST131. Dans un modèle de souris prétraitées par streptomycine, la capacité de colonisation intestinale de la souche ST131 TN03 dépasse celle des autres souches commensales testées (administration par voie entérale d'un mélange de souches dans un rapport de 1:1) (264). Bien que cette étude soit limitée par l'évaluation du potentiel de colonisation d'un seul membre du clone, elle fournit la preuve que certains ST131 peuvent coloniser l'intestin de manière très efficace. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Birgy et coll. mettant en évidence une colonisation intestinale précoce des nouveau-nés par les *E. coli* ST131 commensaux de leurs mères (219).

Croxall et coll. ont comparé le potentiel d'invasion des cellules épithéliales de la vessie de 55 *E. coli* ST131 avec celui de la souche uropathogène de référence, CFT073 (265). 56% des souches ST131 présentait un phénotype hautement invasif (niveau d'invasion 10 fois supérieur à celui de CFT073), 30% présentait un potentiel invasif similaire, et 14% un potentiel d'invasion limité (niveau d'invasion 10 fois inférieur à celui de CFT073).

Les *fimbriae* de type 1, codés par les gènes *fim*, sont des facteurs de virulence essentiels à l'adhésion des UPEC. Le gène *fimB* code pour une recombinase intervenant dans le « *fim* switch » qui permet de passer d'un phénotype OFF à un phénotype ON, et réciproquement. Il a été montré que les gènes *fimB* des virotypes A, B et C du clone ST131 possèdent l'insertion d'une transposase IS3-like (190). Totsika et coll. ont démontré *in vitro* que cette insertion ralentissait l'expression du phénotype ON et favorisait l'expression du phénotype OFF des *fimbriae* de type 1 (266). Totsika et coll. ont également montré chez un modèle murin d'infection urinaire que seules les souches de phénotypes ON étaient capables d'envahir les cellules urothéliales de la vessie. Ces constats soulignent l'importance des *fimbriae* de type I dans la pathogénicité des UPEC et suggèrent l'implication d'une deuxième recombinase permettant l'expression fimbriale ON observée chez la majorité des isolats ST131 (266).

3.3.2.3 Potentiel métabolique

Pour expliquer ce potentiel de colonisation élevé, plusieurs études ont évalué la capacité métabolique du clone ST131. Vimont et coll. ont étudié cette capacité chez la souche ST131 TN03 par la mesure du taux de croissance maximal dans 3 conditions de culture différentes : en milieu « riche » et en milieux « pauvres » contenant soit du gluconate (source principale de carbone au niveau intestinal), soit du glucose. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus avec la souche commensale *E. coli* K-12 MG1655 et deux ExPEC (CFT073 et HT7) (264). La souche ST131 avait un taux de croissance maximal significativement plus élevé que les trois autres souches quel que soit le milieu de culture. Gibreel et coll. ont évalué le potentiel métabolique du clone mondial en utilisant les 47 tests proposés par les cartes Vitek®2 Advanced Expert System™ (bioMérieux) (267). Le bioscore était significativement plus élevé avec les souches appartenant au ST131, en comparaison avec les autres isolats non-ST131 testés. Ces résultats sont en accord avec l'étude d'Hussain et coll. dans laquelle le bioscore était déterminé par 35 réactifs API® (268). Dans chacune de ces études, aucun caractère biochimique n'apparaissait significativement associé au clone mondial.

3.3.2.4 Production de biofilm

La production de biofilm est un facteur de pathogénicité important qui permet de protéger les bactéries contre l'action des antibiotiques et du système immunitaire (269, 270). Plusieurs études se sont intéressées à la capacité du clone ST131 à former du biofilm. Les résultats de ces études divergent. Clermont et coll. ont montré que 2 souches ST131 produisaient du biofilm après 48h, sans toutefois comparer ces résultats à d'autres ExPEC (271). Kudinha et coll. ont observé une plus forte prévalence d'isolats producteurs de biofilm parmi les UPEC appartenant au clone ST131, en comparaison avec les UPEC non-ST131 (223). A l'inverse, Novais et coll. ont montré, sur un panel de 20 souches ST131, que toutes les souches ST131 développaient moins de biofilm que la souche CFT073 et qu'aucune d'entre elles n'était capable de former un biofilm mature (272). Dans le même sens, Olesen et coll. ont montré sur une collection de 128 *E. coli* ST131 isolés entre 1968 et 2012 que seulement 15% des souches avaient une capacité à former du biofilm supérieure à la souche K12 MG1655 (273). Les souches qui présentaient une capacité élevée n'appartenaient pas au sous-clone prédominant H30. Très récemment, Shin et coll. ont montré qu'au sein du clone ST131, la capacité à former du biofilm était supérieure chez les souches qui ne produisaient pas de BLSE (274).

3.3.3 Virulence chez le modèle animal

Le potentiel de virulence du clone ST131 a été évalué *in vivo* dans plusieurs modèles animaux.

La première étude, menée par Clermont et coll. en 2008 dans un modèle murin de sepsis, a montré un potentiel de virulence élevé, comparable à celui des autres UPEC qui possédaient un panel de gènes de virulence plus large (271). L'inoculation intra-abdominale de 4 souches de *E. coli* ST131 (3 virotypes C et 1 virotype B) entraînait la mort de la souris dans les 7 jours. En 2012, chez le même modèle, Johnson et coll. ont montré une variabilité importante du potentiel de virulence des *E. coli* ST131 (275). Parmi une large collection d'ExPEC, le niveau de virulence était corrélé à l'expression de certains facteurs (*papAH*, *papGIII*, *vat*, *kpsM II*, capsule K1, *ibeA* et *clbB/N*) et non à l'appartenance au ST131. Toujours chez la souris, Mora et coll. ont évalué le potentiel de virulence de différents virotypes du clone après injection sous-cutanée (192). Les isolats O25b:H4 de virotypes A, B, et C étaient les plus virulents (mort rapide de 80% des souris dans les 48 heures) tandis que les virotypes D et E présentaient un score final de mortalité à 7 jours plus faible et tuaient les souris plus lentement. Les isolats de sérotype O16:H15 possédaient un score final de mortalité à 7 jours comparable aux isolats virulents de sérotypes O25b:H4 mais tuaient les souris plus lentement. Pour évaluer la virulence du clone ST131, Lavigne et coll. ont utilisé deux autres modèles : le nématode *Caenorhabditis elegans* et les embryons de poisson zèbre (*Danio rerio*) (276). Le potentiel de virulence de 3 souches ST131 (2 souches urinaires de virotype C productrices de CTX-M-15 et 1 souche commensale non productrice de BLSE) a été comparé avec celui de 3 souches de phylotype B2 (1 commensale, 1 urinaire et 1 bactériémique) et 1 souche de phylotype A. Chez le vers, les 3 souches ST131 présentaient un potentiel de virulence supérieur à la souche de phylogroupe A, comparable aux souches commensales B2 et inférieur aux souches cliniques B2 non-ST131. Chez les embryons de poissons, les souches cliniques ST131 apparaissaient moins virulentes que les autres souches testées, à l'exception de la souche commensale B2. La transparence du modèle a permis d'observer un tropisme de certaines souches pour le système nerveux central, au niveau duquel une infection chronique s'installait (Figure 25).

Chez la larve *Galleria mellonella*, Alghoribi et coll. ont évalué le potentiel de virulence de 71 UPEC de différentes lignées (277). Les souches ST131 apparaissaient significativement moins virulentes que les souches non ST131 (ST69, 127, 73 et 95).

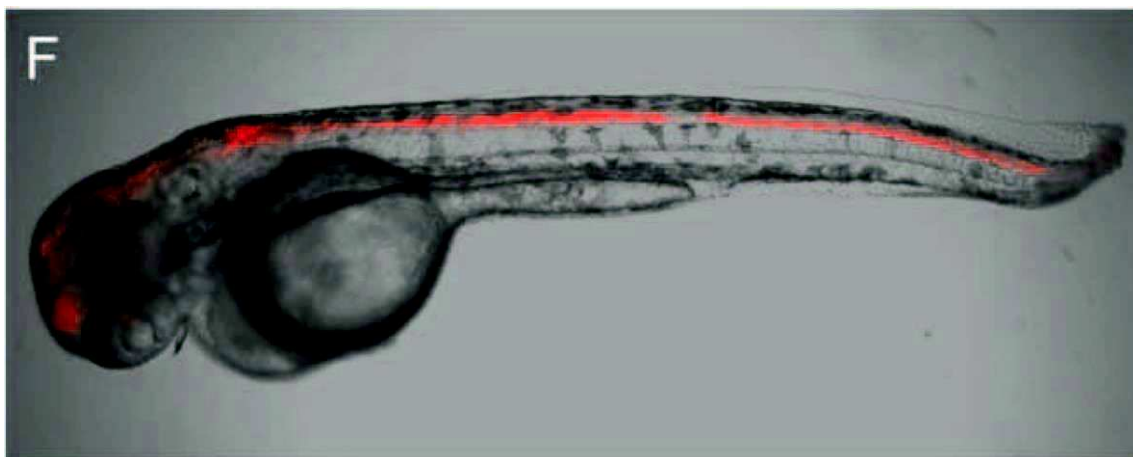


Figure 25. Embryon de poisson zèbre 24 heures suivant la micro-injection de la souche MECB5 (*E. coli* ST131 de virotype C) (276).

MECB5 a été préalablement marqué par une protéine fluorescente (DsRed) afin de mettre en évidence le tropisme de la souche pour le système nerveux central du modèle.

3.4 Résistance des *E. coli* ST131 aux antibiotiques

3.4.1 Généralités

L'espèce *E. coli* appartient au groupe 1 de la classification fonctionnelle des entérobactéries, caractérisé par un phénotype naturellement sensible à toutes les β -lactamines malgré la présence, au sein du génome, d'un gène *ampC* codant pour une céphalosporinase dont l'expression est réprimée à l'état sauvage (278). *E. coli* est également naturellement sensible aux autres classes d'antibiotiques actifs sur les bacilles à Gram négatif, notamment aux aminosides, aux quinolones, aux sulfamides, au triméthoprim, aux tétracyclines et au chloramphénicol.

Cependant, l'espèce *E. coli* illustre bien l'évolution de la résistance aux antibiotiques et l'on assiste, à l'heure actuelle, à la diffusion de souches MDR à la fois en milieu communautaire et hospitalier (7, 9). En raison de l'abondance et du caractère ubiquitaire de *E. coli*, de la fréquence des infections dans lesquelles cette espèce est impliquée, la diffusion des *E. coli* MDR inquiète grandement la communauté médicale.

Des isolats sauvages, c'est-à-dire totalement sensibles aux antibiotiques actifs contre les bacilles à Gram négatif, ont été décrits parmi les souches commensales et cliniques de *E. coli* ST131 (224, 279). Cependant, le clone ST131 allie souvent des résistances à plusieurs classes

d'antibiotiques (12, 273). De ce fait, il est considéré comme l'exemple-type d'un clone MDR (280).

3.4.2 Résistance acquise aux β -lactamines

3.4.2.1 Production de BLSE

Parallèlement à la dissémination des « nouvelles » BLSE de la famille CTX-M, *E. coli* est devenue l'espèce bactérienne la plus concernée par la production des BLSE (1, 7).

La production de l'enzyme CTX-M-15 était une caractéristique commune aux premiers isolats de *E. coli* ST131 identifiés en 2008 (11). Depuis, d'autres variants ont été décrits chez le clone mondial : CTX-M-1, -2, -3, -9, -10, -14, -18, -24, -27, -28, -32, -39, -52, -55, -65, et -103 (179). CTX-M-15 reste, à l'heure actuelle, l'enzyme la plus identifiée chez *E. coli* ST131 au niveau mondial même s'il existe des disparités géographiques : le variant CTX-M-14 est particulièrement rencontré au Canada, en Chine, en Espagne et au Japon, CTX-M-3 est fréquent au Royaume-Uni et CTX-M-27 est commun en France, au Japon et en Suisse. Les souches O16:H5 H41 expriment préférentiellement le variant CTX-M-14 (281). La plupart des gènes codant pour ces enzymes sont portés par des plasmides conjugatifs qui appartiennent au groupe d'incompatibilité IncF. Des plasmides des groupes IncN, IncI1 ou IncA/C ont également été rapportés (179). Des séquences d'insertion comme *ISEcp1* ou *ISCR1* sont capables de mobiliser les gènes *bla*CTX-M et de fournir des promoteurs forts responsables du haut niveau d'expression de la BLSE (282).

Les BLSE de type TEM et SHV ont également été décrites chez le clone ST131 (179).

3.4.2.2 Production de carbapénémases

Les oxacillinases OXA-48-like et les métallo- β -lactamases NDM sont les carbapénémases les plus fréquentes en France (<http://www.invs.sante.fr/>). Ce sont également les enzymes les plus souvent associées à l'espèce *E. coli* à l'échelle mondiale (4). Elles ont été rapportées chez *E. coli* ST131 en France, au Royaume-Uni et aux Etats-Unis (283–286). Les carbapénémases de type KPC-2, VIM-1, IMP-8 et IMP-14 ont également été identifiées chez ce clone (287–292).

3.4.2.3 Autres enzymes

Les isolats du clone ST131 non producteurs de BLSE sont plus fréquemment résistants aux aminopénicillines que les isolats n'appartenant pas à ce clone (179). Cette résistance est due à l'expression plasmidique de gènes codant pour des pénicillinases TEM-1/-2, SHV-1 ou OXA-1. Les gènes *bla*TEM-1 et *bla*OXA-1 sont, de plus, très fréquemment identifiés en association avec le gène *bla*CTX-M-15, sur les plasmides de type IncF (179).

Les céphalosporinases plasmidiques CMY-II et, plus rarement, DHA-1 ont également été identifiées chez *E. coli* ST131 (179).

3.4.3 Résistance acquise aux quinolones

Les premiers isolats ST131 décrits en 2008 étaient tous résistants aux fluoroquinolones (11). De larges études ont montré que cette résistance était courante chez les isolats ST131 sensibles aux C3G, suggérant que l'acquisition de la résistance aux quinolones précédait l'acquisition du gène *bla*CTX-M (195, 293). Deux études françaises et espagnoles ont montré que les *E. coli* O25b:H4, qu'ils soient producteurs ou non de BLSE, étaient de manière générale plus résistants aux quinolones, y compris la ciprofloxacine, que les souches non-ST131 (207, 252). Aux Etats-Unis, il a été montré que 70 à 80% des ExPEC résistants aux fluoroquinolones contre seulement 0 à 7% des ExPEC sensibles appartenaient au clone mondial (217). Comme décrit plus haut (paragraphe 3.1.3.3.), il existe une association étroite entre la résistance aux fluoroquinolones et le sous-clone prédominant H30 (13). L'utilisation extensive des fluoroquinolones a sans doute permis l'expansion du sous clone H30-R qui présente un haut niveau de résistance par une combinaison caractéristique des sous-unités A des topoisomérases : GyrA^{S83L+D87N} + ParC^{S80I+E84V}. De plus, des études *in vivo* suggèrent que la résistance aux fluoroquinolones chez *E. coli* n'entraîne pas de diminution de « fitness », en comparaison aux souches sensibles (171).

En dehors des mutations des topoisomérases, l'expression des PMQRs entraîne un niveau de résistance variable aux quinolones. Le gène *aac(6')-Ib-cr*, entraînant une résistance à la norfloxacine et à la ciprofloxacine, semble plus fréquent chez le clone ST131 (283, 294, 295). En revanche, les PMQRs de type *qnr* ont rarement été décrits chez *E. coli* ST131 (225, 296). A la différence des souches O25b:H4 H30, les isolats O16:H5 H41 apparaissent fréquemment sensibles à cette classe d'antibiotiques (281).

3.4.4 Résistance aux aminosides

Chez le clone ST131, les enzymes classiquement identifiées sont deux acétyltransférases : l'AAC(3)-II, responsable d'une résistance à la gentamicine et à la tobramycine, et l'AAC(6')-Ib-cr, entraînant une résistance croisée à l'amikacine et à la ciprofloxacine (179). En raison de la forte prévalence des enzymes AAC(6')-Ib-cr chez ce clone, les *E. coli* ST131 sont globalement plus résistants à l'amikacine que les *E. coli* non-ST131 (207, 252).

3.4.5 Résistance aux autres antibiotiques

D'autres déterminants de la résistance ont été identifiés chez *E. coli* ST131 (179):

- *catB4* codant pour une acétyltransférase inactivant le chloramphénicol,
- *mph(A)* codant pour une phosphotransférase inactivant les macrolides,
- *tetA* responsable de la résistance à la tétracycline par efflux,
- *dfrA7* entraînant la résistance au triméthoprimine par modification de la cible (DHFR),
- *sulI* entraînant la résistance aux sulfamides par modification de la cible (DHPS).

Les *E. coli* appartenant au clone ST131 ont donc développé des mécanismes de résistance à toutes les classes d'antibiotiques introduites en médecine humaine et animale. Les modifications de l'influx et de l'efflux membranaires peuvent s'ajouter à ces mécanismes de résistance et conduire à l'émergence de souches panrésistantes.

4 Modulation de l'influx et de l'efflux membranaires chez *E. coli*

4.1 Imperméabilité membranaire

Pour atteindre leurs cibles intracellulaires ou périplasmiques chez les bactéries à Gram négatif, les antibiotiques doivent d'abord traverser la membrane externe, ce qu'ils peuvent faire en empruntant deux voies. La diffusion à travers la bicouche phospholipidique serait en théorie possible pour tous les antibiotiques lipophiles, mais la richesse de la membrane externe en LPS fortement chargé négativement rend leur passage lent et relativement difficile. Cette voie de pénétration n'est donc significative que pour les molécules lipophiles trop grandes pour passer à travers les porines (macrolides, rifamycines), ce qui explique en partie la faible sensibilité naturelle des bactéries à Gram négatif vis-à-vis de ces molécules. En revanche, la plupart des antibiotiques de petite taille (inférieure à 600 Da), tels que les β -lactamines, les quinolones, la tétracycline et le chloramphénicol, qu'ils soient hydrophiles ou lipophiles, pénètrent dans la cellule bactérienne en empruntant la voie des porines (Figure 26) (297). Chez *E. coli*, les 2 porines majeures sont OmpF et OmpC.

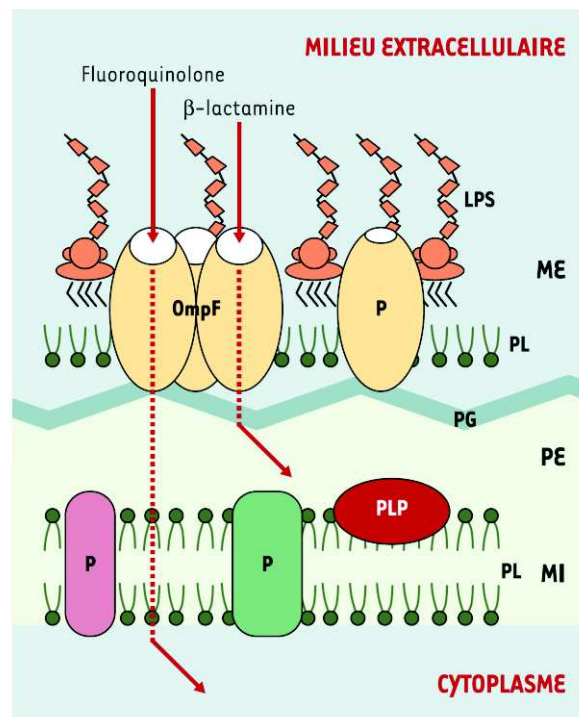


Figure 26. Enveloppe d'*Escherichia coli* et voie de passage des antibiotiques (298).

ME, membrane externe ; MI, membrane interne ; PE, périplasma ; LPS, lipopolysaccharide ; PL, phospholipides ; P, protéines ; PG, peptidoglycane ; PLP, protéine de liaison aux pénicillines.

4.1.1 Structure et fonction des porines

Les porines sont des protéines enchâssées dans la membrane externe, qui font partie de la catégorie des « Outer Membrane Proteins » (OMPs). De manière générale, les OMPs regroupent deux catégories de protéines (297) :

- des protéines de structure qui participent à la cohésion de la paroi bactérienne, telles qu'OmpA,
- des porines plus ou moins spécifiques qui jouent un rôle dans la perméabilité membranaire.

Les porines forment des canaux transmembranaires et permettent la diffusion du milieu extérieur vers l'espace périplasmique, de petites molécules hydrophiles, telles que le fer et les nutriments, mais aussi de certains antibiotiques. Les 2 porines les plus abondantes chez *E. coli* (environ 10^5 copies par cellules) sont OmpC et OmpF. Leurs homologues existent chez les autres espèces d'entérobactéries : OmpK36 et OmpK35 chez *K. pneumoniae*, Omp36 et Omp35 chez *E. aerogenes* (299–302). A celles-ci se rajoute PhoE, une porine impliquée dans le transport des phosphates (303), qui a la particularité de laisser préférentiellement passer les anions, tandis que les porines OmpC et OmpF sont plus sélectives pour les cations (304, 305). D'autres porines très sélectives, comme LamB, ChiP, ScrY et FhuA, sont spécialisées dans le transport des sucres ou des métaux (306–309). Par ailleurs, des porines quiescentes, telles qu'OmpN chez *E. coli* (196), OmpK37 chez *K. pneumoniae* ou OmpS2 chez *Salmonella enterica* (60), ne sont pas produites à l'état normal mais peuvent jouer un rôle en cas de perte d'expression des porines majeures (310–312).

La cristallographie a permis d'élucider la structure tridimensionnelle des porines majeures OmpC et OmpF (313). Celle-ci est conservée chez toutes les protéobactéries (314). Les porines s'assemblent sous forme de trimères et délimitent ainsi trois canaux aqueux qui traversent la membrane externe de part en part (Figure 27A) (297). La partie transmembranaire de chaque monomère présente un arrangement en feuillets β antiparallèles, associant 16 brins formés de 7 à 16 résidus d'acides aminés (Figure 27B). Les brins sont reliés entre eux par des « coudes » serrés du côté périplasmique et par de longues « boucles » du côté extramembranaire. La boucle 2, repliée vers l'extérieur, contribue à la connexion entre deux monomères voisins et à la stabilisation de l'ensemble, tandis que la boucle 3, particulièrement longue, plonge à l'intérieur du canal dont elle rétrécit la lumière (Figure 27C). Au niveau de cette constriction, plusieurs résidus d'acides aminés chargés positivement font face à un « cluster » chargé négativement, créant un champ électrostatique

qui influence la translocation des molécules ionisées à travers la porine. La boucle interne 3 joue un rôle essentiel dans la perméabilité puisque des substitutions d'acides aminés dans cette région hautement conservée modifient les propriétés du canal (taille du pore et sélectivité en fonction de la charge) et la sensibilité à différents antibiotiques (315). Le processus de translocation n'est pas un phénomène de diffusion passive, mais fait intervenir des interactions de type attraction (liaisons hydrogène ou interactions hydrophobes) et répulsion entre la molécule et certains résidus clés localisés sur la surface interne du pore (316). Du fait d'une conformation des boucles différentes, il a été montré que le canal des porines OmpF est légèrement plus large que celui des porines OmpC et permet le passage de solutés plus volumineux (304, 305).

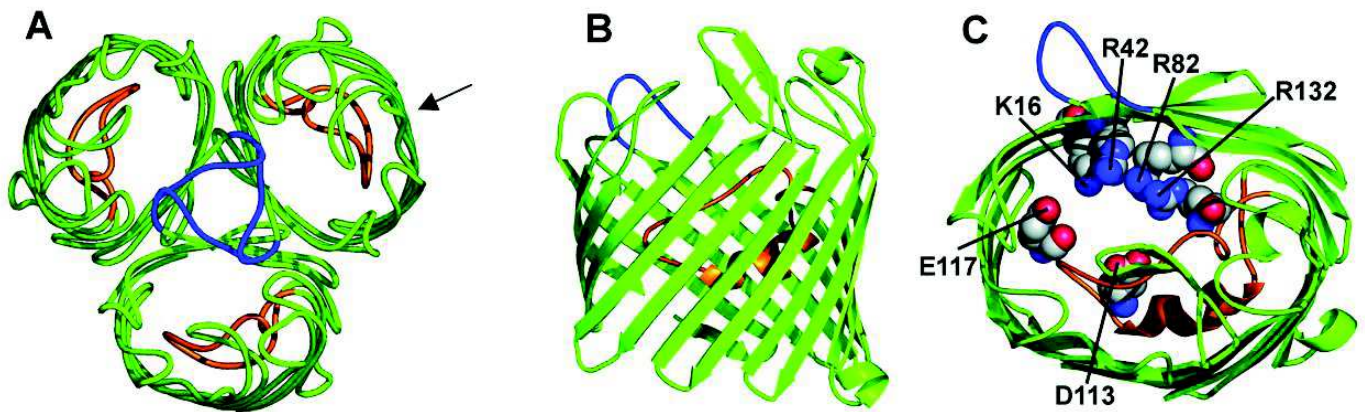


Figure 27. Structure de la porine OmpF de *E. coli* (297).

(A). Trimère de porine vu du dessus, dans la direction perpendiculaire au plan de la membrane externe. La boucle 2, en bleu, permet l'interaction entre chaque monomère. La boucle 3, en orange, obture la lumière du canal.

(B). Unité monomérique vue de côté, dans la direction de la flèche en A. Les flèches vertes représentent la structure en feuillets β -plissés antiparallèles de la chaîne polypeptidique qui constitue le monomère de porine.

(C). Unité monomérique vue du dessus, montrant la partie la plus resserrée du canal et les acides aminés qui la constituent.

4.1.2 Régulation de la perméabilité membranaire

4.1.2.1 Régulation transcriptionnelle

De nombreuses études se sont intéressées à l'expression des porines de *E. coli*. La transcription des gènes *ompC* et *ompF* est régulée par le système à deux composants EnvZ-OmpR (317, 318). La kinase EnvZ est liée à la membrane interne et joue le rôle de senseur. OmpR est un régulateur de réponse cytosolique, qui se lie à la région promotrice des gènes codant pour les porines. Lorsque l'osmolarité et la température sont élevées, OmpR est phosphorylé par EnvZ et active l'expression de *ompC*, codant pour une porine à canaux plus étroits, au détriment de celle de *ompF*. Ces conditions sont retrouvées dans les fluides du corps humain. Ainsi, la diffusion des composés nocifs potentiellement présents, tels que les sels biliaires ou les antibiotiques, se trouve ralentie. Dans le cas contraire, OmpR est à l'état non phosphorylé et l'expression de *ompF* est favorisée afin de faciliter l'entrée de nutriments à travers les pores plus larges de OmpF (319) (Figure 28).

D'autres facteurs, comme un milieu pauvre en nutriments, le pH ou encore la présence d'antibiotiques et d'anesthésiques locaux, influencent la transcription de *ompF* et *ompC* par le biais du système EnvZ/OmpR (320–323).

Un autre système à deux composants, CpxA/CpxR, intervient dans la réponse au stress et la régulation de l'expression des gènes *ompC* et *ompF* (324, 325). L'intégrité de l'enveloppe est contrôlée par deux voies de régulation majeures : CpxAR et σ^E (326, 327). La voie CpxAR est activée en réponse à plusieurs signaux : le pH, l'osmolarité, l'expression d'un LPS défectueux ou des OMPs mal repliées (327). Le régulateur de réponse cytoplasmique CpxR, activé par phosphorylation, se lie directement sur les promoteurs de *ompF* et *ompC* pour moduler leur transcription (325). Les systèmes CpxAR et EnvZ/OmpR sont connectés par MzrA, une protéine de la membrane interne (328, 329) (Figure 28). MzrA, en réponse à l'activation de CpxAR, interagit directement avec EnvZ qui, à son tour, stabilise OmpR sous sa forme activée. La connexion entre ces deux systèmes permet à la cellule bactérienne de s'adapter à de nombreux changements environnementaux (328, 330). Cependant, leur implication est peu décrite chez les souches cliniques résistantes aux antibiotiques.

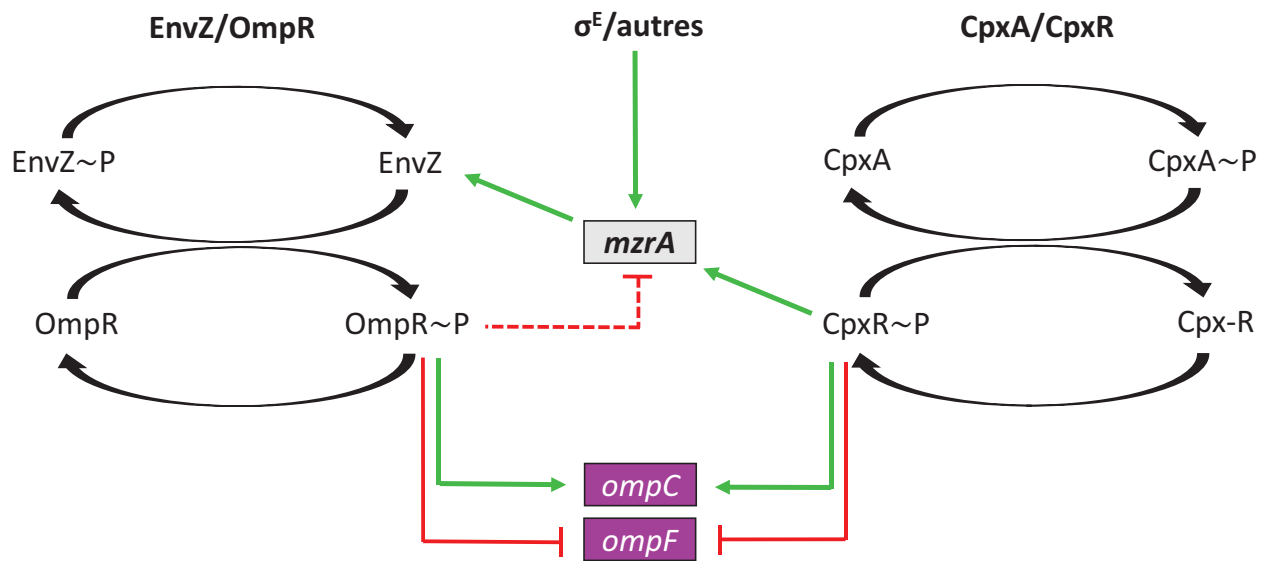


Figure 28. Liaison entre les systèmes de régulation CpxA/CpxR et EnvZ/OmpR médiée par MzrA, d'après (329).

Les effets des régulateurs sont matérialisés par des traits rouges (inhibition) et des flèches vertes (activation). L'activation des voies CpxA/CpxR et σ^E favorise la synthèse de MzrA, qui, à son tour, module l'activité de EnvZ/OmpR pour favoriser l'accumulation de OmpR~P. Des niveaux élevés de OmpR~P régulent positivement l'expression de *ompC*, et négativement celle de *ompF*. Par ailleurs, OmpR~P exerce un rétrocontrôle négatif sur l'expression de *mzrA*.

4.1.2.2 Régulation post-transcriptionnelle

L'expression des gènes *ompC* et *ompF* est également soumise au contrôle post-transcriptionnel de petits ARN régulateurs : MicF, MicC, IpeX, RseX, RybB et CyaR (331, 332). Ces petits ARN anti-sens empêchent la traduction par appariement de bases avec leurs ARN messagers (ARNm) cibles dans la région englobant le site de liaison du ribosome et le codon d'initiation (333). MicF (« mRNA-interfering complementary RNA for *ompF* gene ») est le premier ARN interférant identifié chez *E. coli* (334). Le gène *micF* est situé en amont du promoteur de *ompC*. MicF présente, dans sa partie 5'-terminale, une séquence partiellement complémentaire à celle de l'ARNm du gène *ompF*, ce qui permet leur appariement. Il en résulte une inhibition de la traduction de ce dernier, une augmentation de sa dégradation par les RNases cellulaires et finalement une diminution de la synthèse de la porine OmpF (Figure 29). Dans des conditions d'osmolarité élevées, OmpR active l'expression de MicF, et intensifie l'inhibition de l'expression de OmpF. En outre, l'expression de MicF est

régulée par des facteurs transcriptionnels globaux de la famille AraC/XylS (MarA, SoxS et Rob) qui sont impliqués dans le phénotype de MDR. De la même façon que MicF, l'ARN anti-sens MicC régule l'expression de l'ARNm de OmpC (335). Le gène *micC* est localisé en amont du gène *ompN* qui code pour la porine quiescente OmpN. Il est transcrit dans des circonstances opposées à celles dans lesquelles *micF* est exprimé, c'est-à-dire lorsque la température et la pression osmotique sont peu élevées (Figure 29). Contrairement à MicF et MicC, IpeX ne s'apparie pas avec les ARNm de OmpF et OmpC. Il a été identifié comme un suppresseur des OmpC défectueuses (336). Enfin, l'expression des porines est également régulée par des petits ARN σ E-dépendants: RybB (inhibant l'expression de *ompC*), RseX (ciblant *ompA* et *ompC*), et CyaR (réprimant *ompX*) (333, 337, 338).

4.1.2.3 Régulation post-traductionnelle

La synthèse des porines est également régulée négativement au niveau post-traductionnel par la protéine OmpX par un mécanisme encore mal élucidé (339, 340) (Figure 29). Dans des conditions d'osmolarité élevées, la surexpression de OmpX provoquerait une saturation des protéines chaperonnes indispensables à l'assemblage et à l'insertion correcte des porines dans la membrane externe. Les porines présentant une conformation défectueuse seraient alors dégradées par des protéases de type Deg (341).

4.1.2.4 Régulation globale par les composants de la famille AraC/XylS

La perméabilité de la membrane externe est sous le contrôle global d'une cascade de régulation complexe, qui régit à la fois l'influx (*via* les porines) et l'efflux (*via* les pompes) transmembranaires (342). Une vue d'ensemble de ce système tel qu'il est probablement organisé chez *E. coli* est présentée dans la Figure 29.

Parmi les régulateurs globaux, le mieux étudié est le locus *mar* (« multiple antibiotic resistance »), décrit pour la première fois chez *E. coli* grâce à sa capacité à induire un phénotype de MDR (343, 344). Il est constitué de deux unités de transcription divergentes *marRAB* et *marC*, séparées par la région opératrice *marO*. Le gène *marR* code un répresseur qui empêche de façon constitutive la transcription de l'opéron *marRAB*, tandis que *marA* code un activateur transcriptionnel qui régule l'expression de nombreux gènes. La fonction des produits des gènes *marB* et *marC* est, quant à elle, mal connue. *marB* code pour une petite protéine périplasmique qui réprime la région promotrice *marO*, par un mécanisme indirect inconnu à l'heure actuelle (345). La protéine MarA possède, comme tous les facteurs de type

AraC/XylS, un domaine de liaison à l'ADN de type hélice-tour-hélice et reconnaît une séquence spécifique d'une vingtaine de pnb appelée « marbox » (344). Une telle séquence est présente au sein de la région *marO*, ce qui implique que MarA est capable d'autoactiver la transcription de l'opéron *marRAB* (346). Cet opéron est aussi induit par différents composés chimiques (antibiotiques, acide salicylique, agents oxydants...) et par d'autres activateurs transcriptionnels tels que SoxS et Rob. Le niveau de MarA est contrôlé au niveau post-traductionnel par les protéases Lon (347). L'ensemble des gènes dont l'expression est contrôlée par MarA forment le régulon *mar*, qui comprend plus de soixante gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques, la perméabilité membranaire, la réponse au stress oxydant et le métabolisme (339, 344).

SoxS est l'effecteur du régulon *soxRS*, qui assure chez les entérobactéries la réponse au stress oxydant, et notamment aux composés générateurs de l'ion superoxyde, comme le paraquat (348). Dans le génome de *E. coli*, les gènes *soxS* et *soxR* sont localisés côte à côte avec une orientation opposée (349, 350). L'induction des gènes qui constituent le régulon *soxRS* se fait en deux étapes : en présence d'agents oxydants, le régulateur SoxR favorise l'expression de *soxS* ; le facteur SoxS, produit en grande quantité, active ensuite la transcription des gènes cibles (348). Il a été montré que la protéine SoxR est un homodimère dont chaque chaîne polypeptidique est liée à un groupement prosthétique [2Fe-2S] par l'intermédiaire de quatre résidus cystéine. Une réaction d'oxydation au niveau de ces clusters fer-soufre fait passer SoxR de sa forme réduite [2Fe-2S] inactive à une forme oxydée [2Fe-2S]²⁺ ayant des propriétés d'activateur transcriptionnel (351). Par sa séquence, SoxS appartient à la famille AraC/XylS et agit comme facteur de transcription après fixation sur une séquence d'ADN, « soxbox », présentant une forte homologie avec la « marbox » activée par MarA. De ce fait, les gènes activés par MarA et SoxS tendent à être considérés comme faisant partie d'un même régulon (344, 352). L'expression de SoxS, comme celle de MarA, est contrôlée à un niveau post-traductionnel par les protéases Lon (347).

La protéine Rob est un autre membre de la famille AraC/XylS. Elle a été tout d'abord caractérisée chez *E. coli* par sa capacité à se lier à l'origine de réplication (*oriC*) du chromosome bactérien (353). Sa séquence en acides aminés présente une identité d'environ 50 % avec MarA et SoxS. De plus, il a été montré que Rob active la transcription des gènes appartenant au régulon *mar-soxRS* et reconnaît les mêmes sites de liaison au niveau de l'ADN (« marbox »/« soxbox »/« robbox ») (352, 354). Cependant, contrairement à MarA et SoxS, la protéine Rob n'a pas de répresseur connu et est exprimée de façon constitutive, sans pour

autant engendrer un phénotype de multirésistance aux antibiotiques. C'est en présence d'inducteurs (acides gras à chaîne moyenne, sels biliaires) qui se lient à son extrémité C-terminale que Rob active la transcription de ses gènes cibles (355).

Ces différents régulateurs sont observés chez de nombreuses entérobactéries. Un autre activateur transcriptionnel de la famille AraC/XylS, RamA, a été décrit chez plusieurs espèces au sein desquelles il joue un rôle important : *K. pneumoniae*, *S. enterica*, *E. aerogenes* et *E. cloacae* (342). De façon intéressante le gène *ramA* est absent du génome de *E. coli*.

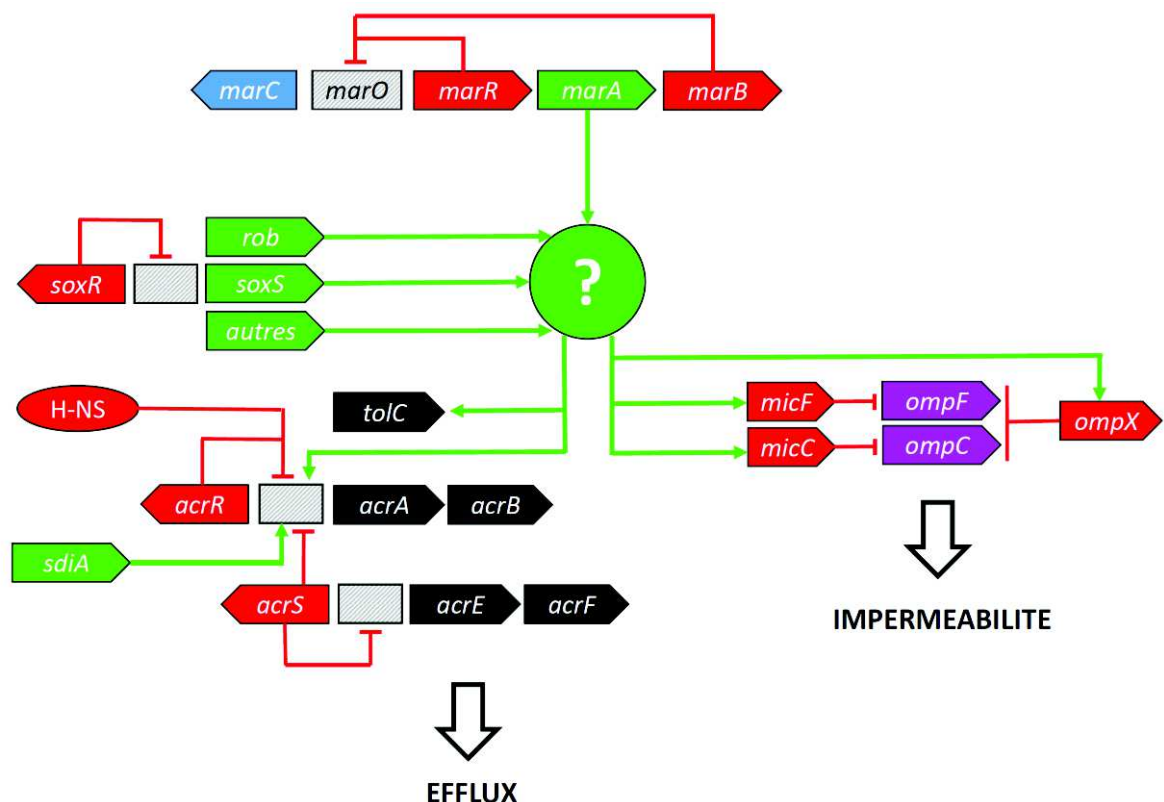


Figure 29. Cascade de régulation de la perméabilité membranaire proposée chez *E. coli*, d'après (14, 332, 342, 344, 345, 354).

Les gènes codant des répresseurs transcriptionnels ou post-traductionnels sont indiqués en rouge, les activateurs en vert. Les effets des différents régulateurs sont matérialisés par des traits rouges (inhibition) et des flèches vertes (activation). Les rectangles hachurés représentent les régions intergéniques où sont localisées les séquences promotrices.

4.1.3 Rôle des porines dans la résistance aux antibiotiques

E. coli, et plus généralement les bacilles à Gram négatif, ont développé différents mécanismes d'altération des porines afin de limiter la pénétration intracellulaire des antibiotiques :

diminution du niveau d'expression des porines, synthèse d'une porine mutée et inhibition des porines par des polyamines (15). L'imperméabilité membranaire est le mécanisme de résistance aux carbapénèmes (ertapénème, imipénème, méropénème, doripénème) le plus fréquemment rencontré en France, devant la production de carbapénémases (356, 357). Il concerne 0,52% des entérobactéries isolées dans les laboratoires en France, contre 0,08% d'isolats producteurs de carbapénémases (356).

4.1.3.1 Diminution de l'expression des porines

Certains isolats cliniques expriment préférentiellement les porines de type OmpC qui possèdent des canaux transmembranaires plus étroits donc plus restrictifs que ceux des porines de type OmpF (15). Ce phénomène a été mis en évidence dans plusieurs collections de souches de *K. pneumoniae* productrices de BLSE (358, 359). Sous pression de sélection antibiotique, ces souches peuvent évoluer vers une imperméabilité totale, par perte de l'expression de la porine restante (359–361). Il a été montré qu'afin de permettre la survie des bactéries, les deux porines majeures absentes sont remplacées par une porine habituellement quiescente, OmpK37 chez *K. pneumoniae* (homologue de OmpN chez *E. coli*) (311). OmpK37 assure alors l'entrée des nutriments tout en limitant la pénétration des antibiotiques en raison de la conformation particulièrement resserrée de son canal. Très récemment, Knopp et coll. ont montré que la perte de « fitness » observée chez *E. coli* en l'absence de OmpF et OmpC, pouvait être compensée par la surexpression de porines alternatives PhoE et ChiP.

D'autre part, la délétion complète du gène peut abolir l'expression des porines, comme cela a été montré chez une souche clinique de *E. coli* résistante à l'ertapénème par délétion du gène *ompC* (362). Les gènes codant pour les porines peuvent également être interrompus prématurément en raison de mutations ou de séquences d'insertion, ou bien présenter des mutations au niveau de leurs promoteurs (289, 363, 364).

Il a été démontré, chez une souche de *K. pneumoniae* sauvage, que la diminution de l'expression des porines majeures se traduisait par une augmentation des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de la céfoxitine et des C3G (365). Lorsque cette diminution d'expression survient chez une entérobactérie résistante aux C3G par production d'une céphalosporinase ou d'une BLSE, le niveau de résistance à l'ensemble des β -lactamines est augmenté, y compris pour les céphalosporines de 4^{ème} génération (C4G : céfépime et cefpirome) et les carbapénèmes (366–368). Les souches productrices de carbapénémases

peuvent également diminuer leur perméabilité membranaire, pour conduire à des souches de très haut niveau de résistance à ces molécules de dernier recours (289, 369).

4.1.3.2 Mutation des porines

La boucle interne 3, qui constitue la région de constriction de la lumière du canal, joue un rôle déterminant sur les propriétés de diffusion des porines. Des mutations survenant à ce niveau peuvent influencer fortement la sensibilité aux antibiotiques qui utilisent cette voie de pénétration (15).

Low et coll. ont étudié plusieurs souches cliniques de *E. coli* recueillies au cours d'une antibiothérapie à long terme chez un patient présentant de multiples abcès du foie (370). Durant trois années, plusieurs classes d'antibiotiques (fluoroquinolones, céphalosporines et carbapénèmes) ont été utilisées successivement. Sept souches isogéniques, dont le niveau de résistance augmentait progressivement, ont été isolées à différents stades du traitement dans les hémocultures ou les abcès du patient. Deux mutations au sein de la porine OmpC (D18E et S274F) ont été objectivées chez tous les isolats. Les deux derniers isolats, obtenus après traitement par imipénème et méropénème, ont montré un haut niveau de résistance à ces antibiotiques et une réduction sévère de la synthèse de OmpC, en comparaison avec les cinq premiers isolats. En plus de sa faible expression, la porine hébergeait une substitution supplémentaire à une position critique de la région interne des canaux (R124H) (371).

La résistance aux carbapénèmes liée à des mutations au niveau de la boucle 3 des porines a également été rapportée chez *E. aerogenes* et *K. pneumoniae* (372–374).

4.1.3.3 Inhibition des porines

Le dernier mécanisme proposé comme pouvant empêcher l'influx des antibiotiques est la production de molécules, les polyamines, capables de bloquer l'entrée du canal des porines.

Les effets des polyamines (putrescine, cadavérine, spermidine et spermine) ont été essentiellement étudiés chez *E. coli* et il a été montré qu'elles inhibaient efficacement les porines OmpC et OmpF (375). La fonction physiologique de ces molécules, synthétisées par les bactéries (sauf la spermine) en condition de stress, serait d'empêcher l'influx de composés toxiques, tels que les acides biliaires ou les antibiotiques, et de favoriser la survie dans le tractus digestif (376).

4.1.4 Impact de l'imperméabilité sur la virulence

La diminution d'expression des porines semble engendrer un coût important pour la bactérie qui devient imperméable à l'entrée des antibiotiques, mais également aux nutriments (377).

Plusieurs études ont montré que l'imperméabilité membranaire s'accompagnait d'une diminution de la virulence des souches (314). Chez une souche de *E. coli* isolée dans les lésions intestinales d'un patient atteint de maladie de Crohn, la suppression de *ompC* affecte la capacité de la bactérie à envahir les cellules de l'intestin grêle, indiquant un possible rôle d'adhésine ou d'invasine pour cette porine (378). Il a également été montré que la suppression de *ompC* et *ompF* chez des souches entérotoxigènes de *E. coli* réduisait significativement leur virulence chez des sujets humains (379). Plus récemment, des études chez la souris et chez le nématode *C. elegans* ont montré une virulence atténuée des isolats de *K. pneumoniae* et *E. aerogenes* MDR qui sous-exprimaient leurs porines (18, 20, 380).

En réponse à une pression antibiotique, la dérégulation d'un des activateurs transcriptionnels de la cascade de régulation peut entraîner un phénotype de MDR global, résultant à la fois d'une diminution de la perméabilité et d'une augmentation de l'efflux (15).

4.2 Efflux membranaire

L'efflux actif est une autre stratégie de résistance mise en œuvre par les bactéries pour expulser l'antibiotique qui a diffusé à l'intérieur de la cellule (périplasme ou cytoplasme) vers le milieu extérieur.

Il existe 5 familles de pompes d'efflux en fonction de la source d'énergie nécessaire à leur fonctionnement (gradient électrochimique ou hydrolyse de l'ATP) et de leur structure second-tertiaire (Figure 30) (126) :

- la famille MATE (« Multidrug and Toxic Compound Extrusion »),
- la famille MFS (« Major Facilitator Superfamily »),
- la famille SMR (« Staphylococcal Multiresistance »),
- la famille RND (« Resistance Nodulation Division »),
- la famille ABC (« ATP Binding Cassette »).

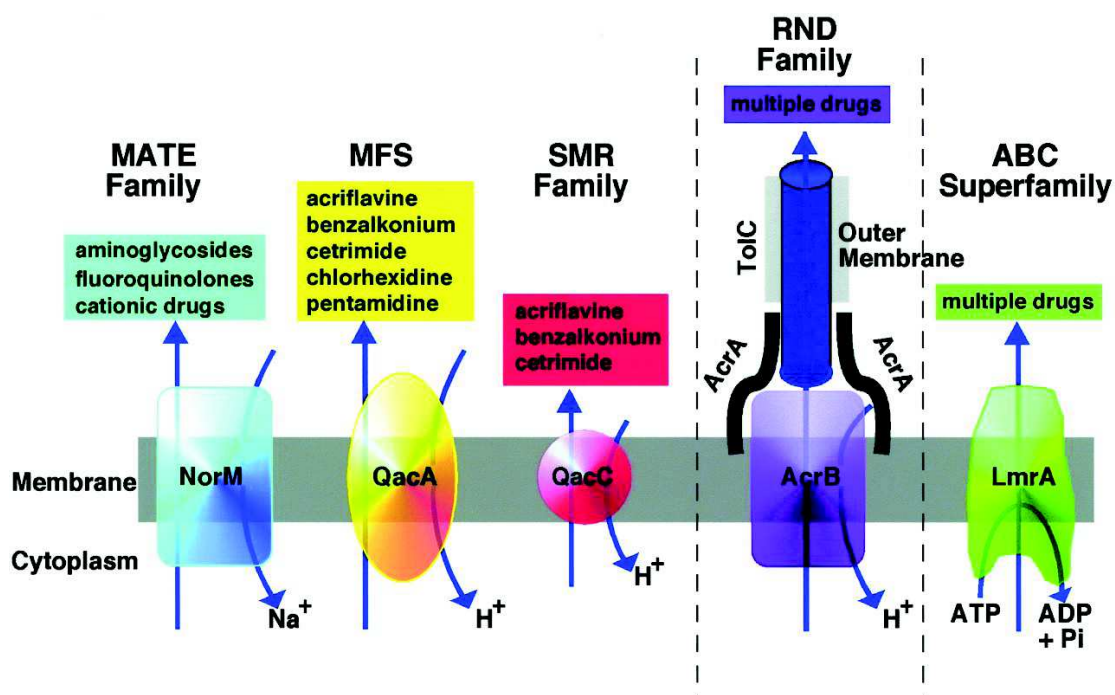


Figure 30. Les 5 grandes familles de pompes d'efflux (190).

Chaque famille de pompes est représentée par un de ses membres. Les principaux substrats efflués et la source d'énergie utilisée pour le transport sont mentionnés.

MATE, Multidrug and Toxic Compound Extrusion ; MFS, Major Facilitator Superfamily ; SMR, Staphylococcal Multiresistance ; RND, Resistance Nodulation Division ; ABC, ATP Binding Cassette.

Les membres de la famille RND sont des systèmes d'efflux tripartites, à la différence des autres transporteurs qui sont constitués d'une seule protéine transmembranaire.

Les pompes RND, MFS et SMR sont des antiporteurs de protons, c'est-à-dire qu'elles emploient l'énergie du gradient de protons transmembranaire pour exporter une molécule de substrat tout en faisant entrer un ion H⁺. Les pompes de la famille MATE utilisent le gradient d'ions sodium comme source d'énergie, en plus de la force proton-motrice, tandis que les transporteurs de type ABC effluent leurs substrats grâce à l'hydrolyse de l'ATP (126).

Certaines pompes d'efflux sont spécifiques d'un type de substrat et confèrent une résistance vis-à-vis d'une seule classe d'antibiotique, comme la pompe Tet (famille MFS) chez *S. aureus* qui est responsable de la résistance aux tétracyclines (381). Cependant, la plupart des transporteurs peuvent prendre en charge des molécules de structure très différente et ainsi contribuer à la MDR (382).

L'analyse du génome a révélé l'existence, chez les entérobactéries, de très nombreux gènes ou opérons codant pour des systèmes d'efflux potentiels. Cependant, une pompe d'efflux

appartenant à la famille RND semble jouer un rôle majeur dans la multirésistance aux antibiotiques : la pompe AcrAB-TolC (14).

4.2.1 La pompe AcrAB-TolC

4.2.1.1 Structure

La pompe d'efflux AcrAB-TolC est exprimée de manière constitutive par de nombreuses entérobactéries (14). Elle présente une forte homologie, au niveau de sa séquence en acides aminés, avec ses équivalents de la famille RND rencontrés dans d'autres groupes bactériens, tels que MexAB-OprM chez *P. aeruginosa*, AdeABC chez *A. baumannii*, CmeABC chez *Campylobacter jejuni* et MtrCDE chez *Neisseria gonorrhoeae* (126).

AcrAB-TolC est un système d'efflux à quatre composantes (14):

- une protéine de transport insérée dans la membrane plasmique : AcrB,
- une protéine formant un canal dans la membrane externe : TolC,
- une protéine adaptatrice périplasmique ou protéine de fusion : AcrA,
- une petite protéine découverte récemment, associée au domaine transmembranaire de AcrB : AcrZ (383).

Les données cristallographiques ont permis de modéliser leur agencement (384, 385) (Figure 18).

La protéine AcrB s'associe en un homotrimère, chaque unité possédant 12 hélices transmembranaires et un grand domaine périplasmique (386). Celui-ci se termine par une sorte de coiffe, en forme d'entonnoir, dont le pore permet l'interaction avec TolC et dont la partie évasée délimite une cavité centrale avec 3 vestibules s'ouvrant dans le périplasma. Cette structure est compatible avec un transport de substrats à partir du cytoplasme et à partir de l'espace périplasmique. Une fois rassemblés dans la cavité centrale, les substrats sont transportés activement à travers le pore, vers le tunnel formé par TolC qui assure leur expulsion. L'énergie nécessaire au transport de chaque substrat est fournie par l'entrée concomitante d'un ion H⁺.

L'assemblage de 3 monomères de protéine TolC forme un long tunnel s'étendant à travers la membrane externe jusque dans le périplasma (387). L'extrémité proximale ou périplasmique de ce tunnel est fermée par un ensemble d'hélices enroulées qui peut s'ouvrir, par un mécanisme allostérique, pour laisser passer une molécule de substrat.

La structure de la protéine adaptatrice AcrA peut être déduite à partir de celle de son homologue chez *P. aeruginosa*, MexA, formé d'un enchaînement feuillet β / domaine lipoyl / longue hélice α en épingle à cheveux (Figure 31C) (385, 388). Les monomères de AcrA s'assemblent par 6 pour former une « gaine » autour de TolC et AcrB (Figure 31A,B) (14, 385).

AcrZ se replie en une longue hélice α majoritairement hydrophobe qui interagit avec le domaine transmembranaire de AcrB. Son extrémité N-terminale se trouve dans le périplasma et son extrémité C-terminale dans le cytoplasme, où elle interagit avec la partie hydrophile de AcrB, proximité de la membrane (385).

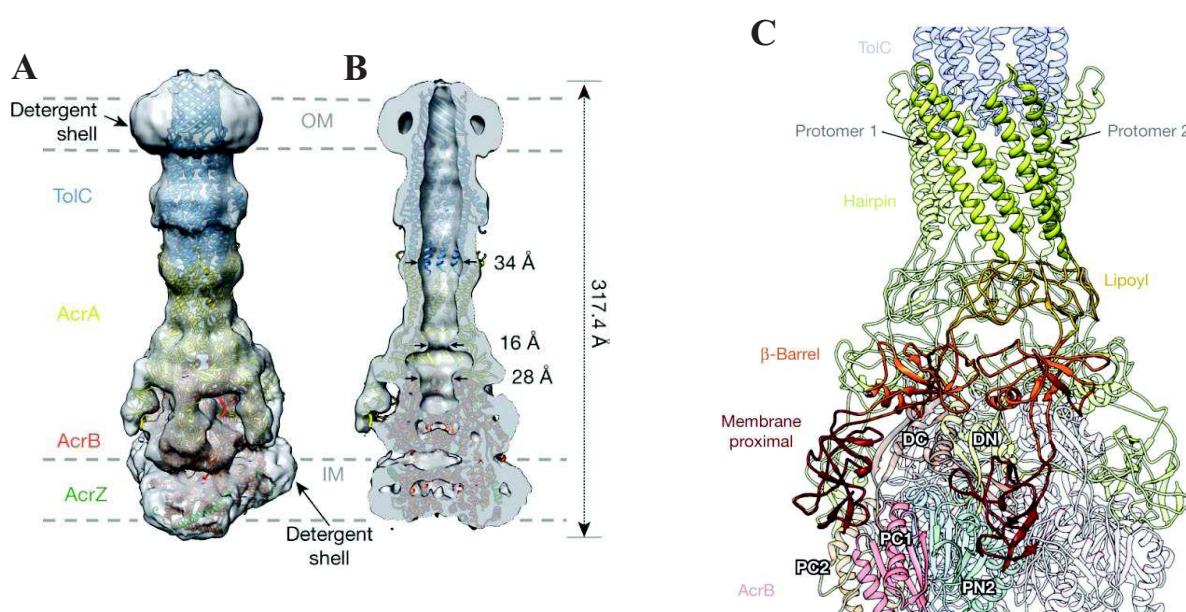


Figure 31 : Modèle de structure proposé pour la pompe d'efflux AcrAB-TolC (385).

(A). Modèle pseudo-atmique de la pompe à efflux. La protéine de transport (AcrB) est représentée en orange, tandis que celle formant un canal dans la membrane externe (TolC) apparaît en bleu. Un anneau constitué de 6 molécules de protéine périplasmique (AcrA), en jaune, assure la liaison entre ces deux éléments. La protéine associée au domaine transmembranaire de AcrB (AcrZ) apparaît en vert. L'ensemble a une masse de 771 kDa.

OM, Outer Membrane ; IM, Inner Membrane.

(B). Coupe du modèle pseudo-atmique qui montre le conduit continu allant de l'entonnoir AcrB à la porine TolC.

(C). Représentation des interactions entre le domaine hélice α en épingle à cheveux de AcrA avec TolC et les feuillets β de AcrA avec AcrB. Les domaines lipoyl n'interagissent pas avec AcrB et TolC.

4.2.1.2 Substrats

Le rôle physiologique des pompes d'efflux en général, et de la pompe d'efflux AcrAB en particulier, est de favoriser la survie des bactéries en leur permettant d'éliminer les composés toxiques présents dans leur environnement. Le milieu naturel dans lequel vivent les entérobactéries, c'est-à-dire le tube digestif de l'homme et des animaux, est riche en substances antimicrobiennes telles que les sels biliaires et les acides gras. Ces composés sont justement des substrats de la pompe AcrAB, dont le rôle dans la tolérance à la bile a été démontré chez *E. coli* (389).

D'une manière générale, la pompe AcrAB-TolC est capable d'effluer une grande variété de substrats (14, 390) :

- les sels biliaires,
- les acides gras,
- les stéroïdes,
- les colorants (cristal violet, bromure d'éthidium, acriflavine),
- les détergents (dodécylsulfate de sodium, Triton® X-100),
- les antiseptiques (triclosan),
- les antibiotiques (quinolones, chloramphénicol, cyclines, β -lactamines, macrolides, oxazolidinones, triméthoprim, rifampicine, novobiocine, acide fusidique).

Parmi les β -lactamines, il semblerait que l'efflux soit le plus efficace pour les molécules les plus lipophiles (oxacilline et cloxacilline, et à un moindre niveau pénicilline G, carboxy- et uréidopénicillines, céfoxitine et céfuroxime), probablement grâce à leur association aux phospholipides de la membrane plasmique qui facilite leur capture par AcrB (391, 392).

4.2.1.3 Régulation

Les gènes *acrA* et *acrB* sont juxtaposés et organisés en opéron, tandis que les gènes *tolC* et *acrZ* sont localisés dans un endroit différent du chromosome. Leur expression est cependant régulée à plusieurs niveaux par des régulateurs communs (14).

L'expression de l'opéron *acrAB* est régulée au niveau local par son répresseur AcrR, dont le gène est situé immédiatement en amont de *acrA* avec une orientation opposée (Figure 16) (393). A un niveau plus global, elle est également sous le contrôle de la cascade de régulation qui régit la perméabilité membranaire (Figure 16). En effet, le promoteur de l'opéron *acrAB* présente une séquence de type « marbox »/« soxbox »/« robbox » et fait partie de l'ensemble des gènes appartenant au régulon *mar-soxRS* (352). Il a ainsi été montré que son expression

est augmentée par les activateurs transcriptionnels MarA, SoxS et Rob, et que cette surexpression participe au phénotype de MDR (344, 394). D'autres régulateurs, comme le répresseur AcrS de la pompe AcrEF, le récepteur du quorum sensing SdiA et les protéines H-NS (« Histone-like Nucleoid Structuring protein ») participent également à la régulation de AcrAB chez *E. coli* (Figure 16) (395–397).

Les gènes *acrZ* et *tolC* sont également régulés positivement par MarA, SoxS, et Rob (383, 398). Le gène *tolC* possède deux promoteurs distincts. Le premier promoteur possède une séquence de type « marbox » tandis que le second est activé par deux autres systèmes de régulation, EvgAS et PhoPQ (398).

4.2.1.4 Impact sur la résistance aux antibiotiques

La pompe AcrAB-TolC est capable d'expulser une grande variété d'antibiotiques à l'exception des aminosides (14).

Son expression constitutive chez les entérobactéries participe à leur résistance intrinsèque à un certain nombre de molécules lipophiles (pénicilline G, oxacilline, macrolides, oxazolidinones, novobiocine, acide fusidique), au même titre que la barrière formée par la membrane externe (126). Il a en effet été montré que l'inactivation de cette pompe chez des souches sauvages pouvait augmenter considérablement leur sensibilité à ces agents (399).

Le système AcrAB-TolC joue également un rôle dans la résistance acquise aux antibiotiques, *via* une augmentation de son expression. Trois types d'évènements génétiques peuvent être à l'origine de cette surexpression : *i*) une mutation dans le gène répresseur local *acrR*, *ii*) une surexpression des activateurs globaux de la MDR, et *iii*) une modification de la région promotrice de l'opéron *acrAB*.

- **Mutation du gène *acrR***

La présence de mutations inactivatrices dans le gène *acrR* entraîne une dérégulation de l'opéron *acrAB* et en un phénotype de MDR. De telles mutations ont été rapportées chez des isolats cliniques de *E. coli*, *S. enterica*, *E. aerogenes* et *K. pneumoniae* (400–407). Ces mutations peuvent être des substitutions d'acides aminés, touchant en particulier les motifs hélice-tour-hélice impliqués dans la liaison de la protéine AcrR à l'ADN cible, des délétions de plusieurs acides aminés ou des insertions créant des décalages du cadre de lecture ou des codons stop.

▪ **Surexpression des activateurs de la cascade de régulation**

Des mutations au sein des gènes *marR* ou *soxR*, ayant pour effet une surexpression des activateurs transcriptionnels MarA ou SoxS, ont été décrites chez de nombreuses souches cliniques de *E. coli* et sont corrélées à un phénotype de multirésistance par efflux et imperméabilité (406, 408–410). La surexpression de *sdiA* entraîne également une augmentation des CMI des fluoroquinolones et des C3G (396, 411). Chez les autres espèces d'entérobactéries, la surexpression de *ramA*, liée à des mutations de *ramR*, semble être le mécanisme majoritairement impliqué (412, 413).

▪ **Modification de la région promotrice de l'opéron *acrAB***

Ce mécanisme est hypothétique dans le cas de l'opéron *acrAB* et n'a jamais, à notre connaissance, été mis en évidence chez des isolats cliniques. Néanmoins, la surexpression de *acrEF* codant pour une pompe d'efflux homologue à AcrAB, causée par la présence d'une séquence d'insertion (IS) porteuse de séquences promotrices en amont de cet opéron, a été décrite chez des mutants de *S. enterica* et de *E. coli* sélectionnés *in vitro* (414–416).

La pompe AcrAB-TolC présentant une faible spécificité de substrat, sa surexpression se traduit par une multirésistance aux antibiotiques, c'est-à-dire par définition une diminution de sensibilité à au moins trois classes différentes d'agents anti-infectieux. La résistance conférée est en général de bas niveau et les CMI des molécules impactées peuvent ne pas atteindre les concentrations critiques fixées pour définir la résistance clinique. Cependant, selon une hypothèse intéressante, l'augmentation de l'efflux pourrait être la première étape grâce à laquelle les bactéries pourraient acquérir des mécanismes de résistance supplémentaires, sous pression de sélection (14, 126). En effet, l'efflux diminue la concentration intracellulaire de l'antibiotique, permettant un délai de survie plus long, pendant lequel des mutations spontanées dans les gènes codant pour les protéines cibles peuvent apparaître.

De nombreuses données de la littérature soulignent l'importance clinique du mécanisme d'efflux. Ainsi, la contribution de la surexpression de AcrAB dans la résistance de haut niveau aux fluoroquinolones, en association avec des mutations des QRDRs de *gyrA* et/ou *parC*, a été clairement démontrée chez *E. coli* (151) et *K. pneumoniae* (413, 417). De même, cette pompe est impliquée dans la moindre sensibilité à la tétracycline, à la tigécycline, au chloramphénicol et aux β -lactamines (notamment les céphamycines) (20, 341, 413, 418).

4.2.2 Les autres pompes

Chez *E. coli*, l'opéron *acrEF* et *acrD* codent également pour des pompes à efflux (419, 420). Les protéines AcrE et AcrF présentent 80% et 88% d'homologie avec AcrA et AcrB, respectivement (419). Elles s'associent avec le canal TolC pour former une pompe RND (415). La pompe AcrEF-TolC expulse les mêmes substrats que son homologue AcrAB-TolC (421). Elle serait capable de prendre le relai de la pompe AcrAB-TolC, lorsque celle-ci n'est plus fonctionnelle (415). Son rôle dans la résistance à la tétracycline et à la tigécycline a été clairement démontré (341, 422, 423).

AcrD est un homologue de AcrB qui s'associe à AcrA et TolC pour former une pompe tripartite (424). A la différence de AcrB, il est capable d'expulser les molécules très hydrophiles comme les aminosides (420, 424).

E. coli possède également d'autres systèmes d'efflux de type RND : MdtEF (YhiUV), responsable de l'expulsion de métabolites toxiques et des acides biliaires, et MdtABC, capable d'expulser les acides biliaires, la norfloxacine, la novobiocine et la cloxacilline (425–428).

E. coli exprime également des pompes appartenant aux familles MFS (MdfA, EmrAB, EmrD, EmrKY), SMR (EmrE) et ABC (MacAB-TolC) (14). Leur impact sur la résistance aux antibiotiques est mal connu à ce jour.

4.2.3 Inhibiteurs des pompes à efflux

La découverte de molécules inhibitrices a contribué à l'étude des systèmes d'efflux. Les agents découplants, tels que la Carbonyl Cyanide m-ChloroPhényl-hydrazone (CCCP) et le DiNitroPhénol (DNP), dissipent le gradient de protons transmembranaire et empêchent le fonctionnement des pompes qui utilisent la force proton-motrice (126). Une autre famille de composés dits « peptido-mimétiques » sont capables d'inhiber les pompes RND par un mécanisme de compétition avec le substrat (429). Le chef de file de cette famille est le Phénylalanine Arginine- β -Naphthylamide (PA β N) dont l'activité a été démontrée sur la pompe AcrAB des entérobactéries (430). L'utilisation thérapeutique du PA β N, en association avec un antibiotique substrat des pompes d'efflux dont il potentialiserait l'action, est impossible en raison de sa toxicité. Des propriétés inhibitrices de pompes d'efflux ont aussi été démontrées pour d'autres classes de molécules, certaines d'entre elles étant des médicaments déjà utilisés chez l'homme. Il s'agit de dérivés de l'artémisinine (antipaludéen), des arylpipéridines et arylpipérazines (antidépresseurs de la famille des inhibiteurs de

recapture de la sérotonine), de dérivés de la quinoline (analogues structuraux des quinolones) ou encore de la chlorpromazine (antipsychotique) (14, 430).

4.2.4 Rôle de l'efflux dans la virulence

Les bactéries, par l'intermédiaire des pompes à efflux, exportent des composés qui leurs sont toxiques, comme les antibiotiques, mais aussi des facteurs de virulence importants pour la colonisation des cellules humaines et animales et pour la pathogénicité (adhésines, toxines, système de capture du fer) (390).

Ce rôle dans la pathogénicité a été particulièrement étudié chez les pompes de la famille RND. Chez *S. enterica*, plusieurs études montrent que la pompe à efflux AcrAB-TolC est essentielle à la colonisation des cellules intestinales humaines et animales (19, 431–433). De même, chez *Neisseria gonorrhoeae*, la pompe MtrCDE est importante pour l'invasion du système génital de la souris (434). Chez *P. aeruginosa*, la suppression de la pompe MexAB-OprM affecte la capacité des bactéries à envahir les cellules épithéliales et réduit la virulence dans un modèle de souris (435). Enfin, chez *K. pneumoniae*, les mutants surexprimant les systèmes AcrAB-TolC ou OqxAB sont significativement plus virulents chez la souris et chez *C. elegans* (18, 436, 437).

Chez *E. coli*, un lien entre les systèmes d'efflux et la virulence a été mis en évidence uniquement pour la pompe de type ABC MacAB-TolC, qui est impliquée dans l'export de l'entérotoxine II produite par les ETEC (438).

Par ailleurs, il a été montré que la suppression de différents systèmes d'efflux (RND, MFS, SMR ou ABC) entraînait une diminution de la formation du biofilm chez *S. enterica*, *E. coli* et *Stenotrophomonas maltophilia* (439–441).

Au vu de ces données, il semble intéressant d'étudier si l'imperméabilité, d'une part, et l'efflux, d'autre part, ont un impact sur le fitness et la virulence du clone mondialement répandu *E. coli* ST131.

TRAVAUX ORIGINAUX

1 Epidémiologie de la multirésistance aux antibiotiques chez les entérobactéries

Les bactéries MDR ne sont sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques utilisables en thérapeutique en raison de l'accumulation de résistances naturelles et/ou acquises à au minimum 3 familles d'antibiotiques. La multirésistance constitue une première étape vers l'impasse thérapeutique. Avec l'émergence des EBLSE de type CTX-M dans les années 2000, la prévalence des entérobactéries MDR a fortement augmenté dans les établissements hospitaliers mais aussi en milieu communautaire (1, 7). Depuis 2011, les infections à EBLSE sont devenues plus fréquentes que celles à SARM en France (442).

Pour traiter les infections à EBLSE, les carbapénèmes, des β -lactamines de « dernier recours » à très large spectre, ont été largement utilisés (48). Cependant, l'émergence et la diffusion mondiale des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes inquiètent grandement la communauté médicale (4). Cette résistance s'explique par deux mécanismes :

- un défaut d'accumulation de l'antibiotique à l'intérieur de la cellule bactérienne,
- une inactivation de l'antibiotique par l'acquisition de gènes codant pour des carbapénémases.

Les infections par EPC constituent une véritable impasse thérapeutique, d'où leur dénomination de Bactéries Hautement Résistantes émergentes (BHRe). La collecte d'informations, basée sur une surveillance locale des taux de résistances, est apparue capitale pour estimer les changements de sensibilité des pathogènes. Des programmes de surveillance de cette expansion de la résistance se sont ainsi développés en France. Depuis le 1^{er} Février 2011, le Service de Microbiologie du CHU de Nîmes a été désigné Laboratoire Régional Référent dans la détection et l'identification des bacilles à Gram négatif multi- et hautement résistants par l'Agence Régionale de Santé (ARS) du Languedoc-Roussillon. Nous coordonnons cette activité, avec le Pr Jean-Philippe Lavigne, pour limiter la diffusion de ces bactéries.

Cette thématique a fait l'objet de plusieurs études épidémiologiques dans le Sud de la France. Nous nous sommes tout d'abord intéressés à la prévalence du portage digestif des entérobactéries résistantes aux C3G dans une population peu investiguée, la population pédiatrique. Nous avons montré que 15,2% des enfants présentant une diarrhée aiguë

(N=1118), hospitalisés en 2012 dans sept établissements du Sud de la France, étaient colonisés par une entérobactérie résistante aux C3G. La principale espèce concernée était *E. cloacae* (59,9%), suivie d'*E. coli* (34,5%). La prévalence du portage d'EBLSE a été estimée à 5,2% (enzymes majoritairement de type CTX-M) (**publication n°1**).

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'épidémiologie moléculaire des souches d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes envoyées pour expertise au Laboratoire Référent du Languedoc-Roussillon. Parmi les 151 souches d'entérobactéries résistantes collectées entre 2011 et 2013, 32 EPC ont été identifiées. Les enzymes étaient essentiellement des OXA-48 (94%, n=30) produites par des souches de *K. pneumoniae* appartenant aux ST101 (43%, n=9), ST15 (28%, n=6), ST395 (14%, n=3), ST405 (10%, n=2) et ST17 (5%, n=1). Les autres espèces productrices d'OXA-48 étaient des *E. coli* (n=8) et un *E. cloacae*. Seulement deux souches produisaient l'enzyme KPC. La majorité des entérobactéries (n=117) étaient résistantes aux carbapénèmes par un mécanisme d'imperméabilité membranaire, associé à la production d'une céphalosporinase chromosomique (déréprimée ou plasmidique) ou à celle d'une BLSE (**publication n°2**).

En 2014, les EPC de type NDM ont émergé dans notre région (Figure 32, données non publiées). Parmi les 120 EPC identifiées par notre Laboratoire en 2014-2015, les enzymes OXA-48 ne concernaient plus que 66% des souches (n=79). Les carbapénémases de type NDM, absentes en 2011-2013, ont été identifiées dans 31% des cas (n=37). Un clone majoritaire de *K. pneumoniae* ST147 (n=12, isolées dans quatre établissements de soins) semble être en partie responsable de cette diffusion régionale des enzymes NDM (Figure 33). Les autres EPC (KPC n=2, VIM n=1 et IMI n=1) ont été isolées de manière sporadique et n'ont pas entraîné de cas secondaires (**publication en cours d'écriture**).

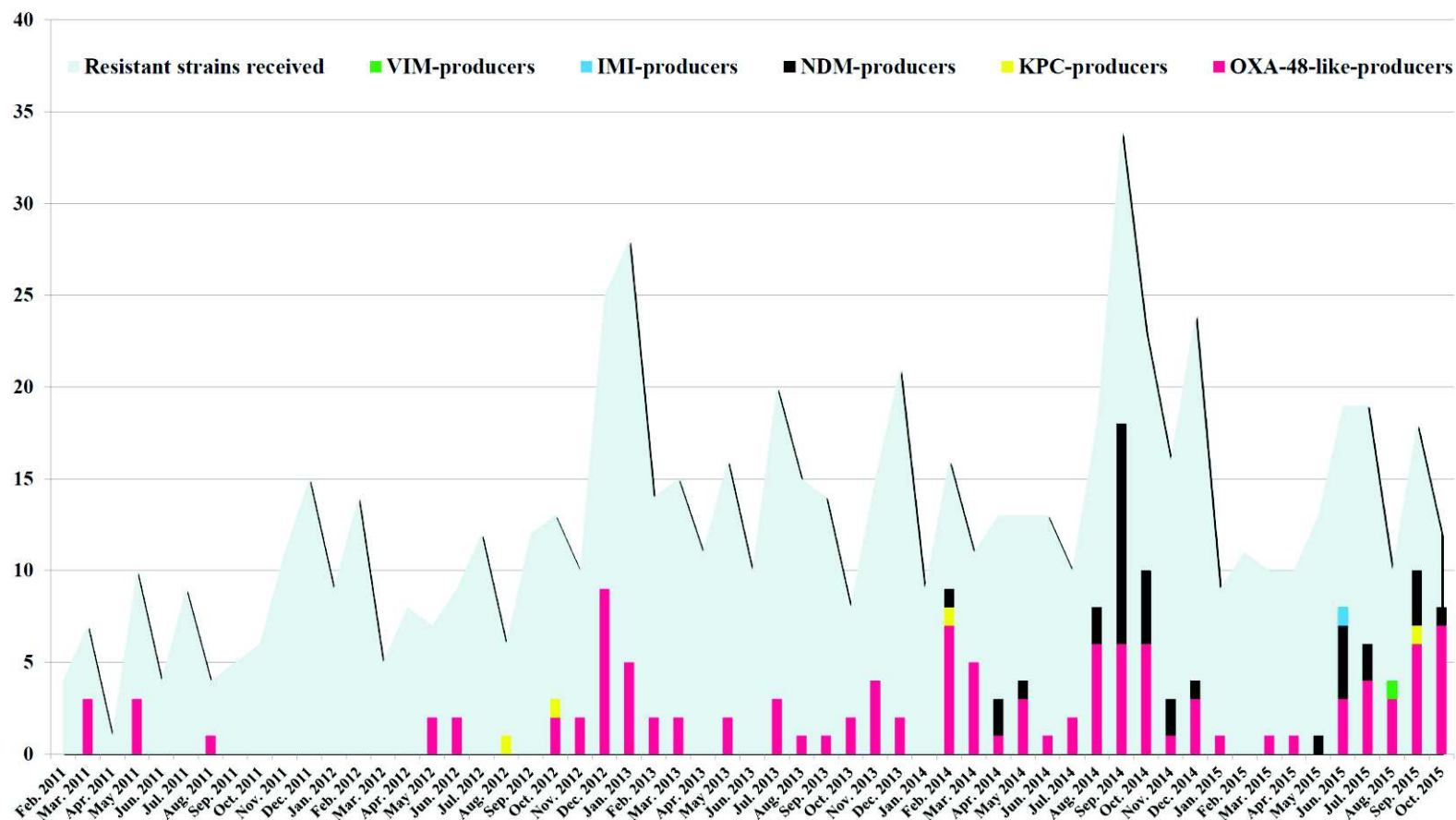


Figure 32. Evolution du nombre de souches d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes (n=724) et productrices de carbapénémases (n=157) reçues, par mois, au Laboratoire de Microbiologie du CHU de Nîmes, depuis Février 2011.

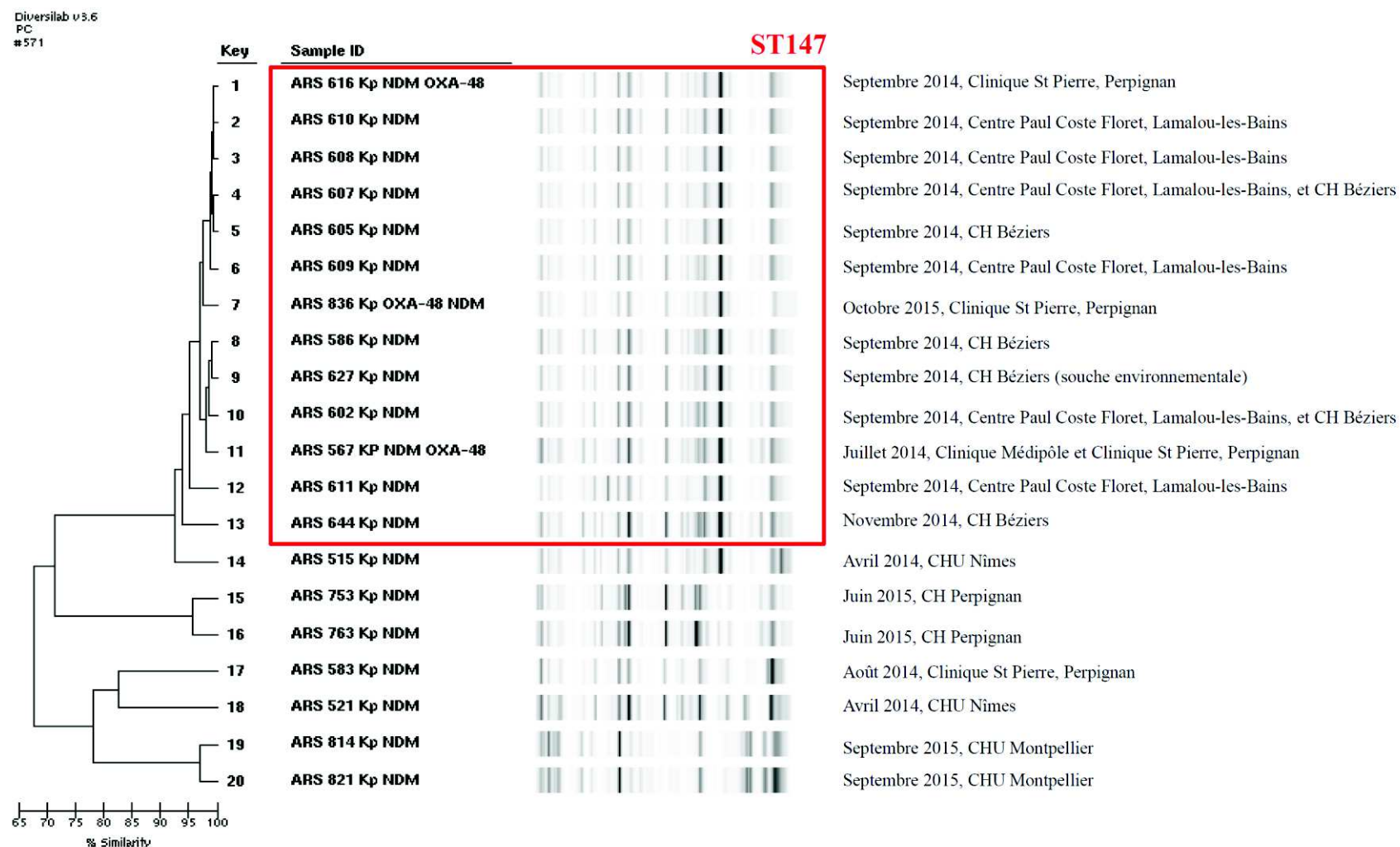


Figure 33. Dendrogramme basé sur l'analyse par rep-PCR (diversiLab®, bioMérieux) des souches de *K. pneumoniae* productrices de NDM (\pm OXA-48) adressées au Laboratoire de Microbiologie du CHU de Nîmes (2014-2015).

Parallèlement à l'analyse des souches adressées à notre Laboratoire, nous avons étudié la prévalence des colonisations à entérobactéries résistantes aux carbapénèmes dans le Sud de la France. De Février 2011 à Mai 2012, 1135 selles ou dépistages rectaux ont été recueillis dans 7 Centres Hospitaliers du Sud de la France. La prévalence du portage digestif d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes et d'EPC était très faible : 0.35% (n=4) et 0.09% (n=1), respectivement. Par ailleurs, cette étude nous a permis d'évaluer les performances de deux nouveaux milieux de dépistage des EPC : chromID® CARBA et chromID® OXA-48 (bioMérieux) (**publication n°3**).

Le Service de Microbiologie du CHU de Nîmes est également, depuis peu, laboratoire expert auprès de l'ONERBA (Observatoire National de l'Epidémiologie et de la Résistance Bactérienne) ce qui nous permet de poursuivre nos travaux à un niveau national.

Nous avons ainsi participé à l'étude nationale de prévalence des EPC parmi les entérobactéries isolées dans les infections des patients hospitalisés en France entre Novembre 2011 et Avril 2012. Durant cette période, 133 244 isolats d'entérobactéries ont été identifiés dans les 71 hôpitaux participants. La prévalence des EPC a été estimée à 0,08% pour l'ensemble des espèces (0,01% pour *E. coli* et 0,27% pour *K. pneumoniae*). Le taux d'incidence des EPC pour 1000 jours d'hospitalisation était faible (0.0041), très inférieur à celui des isolats résistants aux carbapénèmes, tous mécanismes confondus (0,1250) (**publication n°4**).

Toujours en collaboration avec l'ONERBA, nous avons participé à l'étude moléculaire des clones de *K. pneumoniae* producteurs d'OXA-48 émergeant en France. Cinquante-trois souches isolées entre 2011 et 2013 dans 21 établissements français ont été analysées. Nous avons montré que les clones qui prédominaient dans notre région (ST15, ST101, ST395, ST405) étaient également les plus répandus sur le territoire français (**publication n°5**).

Une collaboration avec l'Université de Constantine, dans le Nord-Est de l'Algérie, nous a permis d'étudier l'épidémiologie moléculaire des *E. coli* MDR dans un hôpital militaire de cette région, en 2011-2012. La production de BLSE et la MDR concernaient 18,7% et 20,9% des 448 isolats analysés, respectivement. La prévalence du clone ST131, clone non rapporté jusqu'à présent en Algérie, a été évaluée à 11,9% parmi les *E. coli* producteurs de BLSE. Une souche produisait la carbapénémase OXA-48 (**publication n°6**).

Les animaux d'élevage, en particulier la volaille dont la viande possède des taux élevés de contamination bactérienne (230), sont des vecteurs de la résistance aux antibiotiques chez

l'Homme. Nous avons ainsi étudié la clonalité des *E. coli* aviaires commensaux et humains (souches commensales des fermiers et isolats cliniques d'un hôpital militaire) résistants aux quinolones, dans cette même région du Nord-Est de l'Algérie. 44.3% des *E. coli* aviaires étaient MDR. La résistance à la ciprofloxacine chez ces isolats était élevée (prévalence globale de 51,4%), y compris dans les fermes n'ayant pas recours à des antibiotiques de la classe des quinolones. Aucun des isolats aviaires étudiés n'appartenait au clone ST131, suggérant que le succès de ce clone est avant tout un phénomène humain. L'analyse de la clonalité des souches par rep-PCR a montré que 3 clones (de ST21, ST48 et ST471) étaient communs aux souches aviaires et aux isolats cliniques humains. Un autre clone (de ST108) a été identifié à la fois chez les souches aviaires et les souches commensales humaines. Cette étude suggère un lien épidémiologique étroit entre les souches résistantes aux fluoroquinolones d'origines aviaire et humaine (**publication n°7**).

Devant la pénurie de nouveaux antibiotiques actifs contre les entérobactéries, la prévention de la transmission croisée des BHRe est un enjeu majeur pour limiter leur dissémination. Ainsi, en collaboration avec l'équipe opérationnelle d'hygiène du CHU de Montpellier, nous avons montré l'intérêt de la mise en place d'un registre dynamique de suivi des patients porteurs de BHRe et de leurs patients « contact » (**publication n°8**).

Nous avons également montré l'importance de l'analyse de la clonalité des EPC dans les Centres Experts. Cette analyse nous a permis de relier 4 cas éloignés dans le temps (Juin 2012 à Février 2014) impliquant des *K. pneumoniae* productrices d'OXA-48 dans le Service de Réanimation Médicale de notre CHU, et d'identifier un réservoir environnemental dans ce Service. L'épidémie a pu être contrôlée par l'éradication de ce réservoir (**publication n°9**).

La détection précoce des BHRe par les laboratoires est aussi un élément essentiel de la lutte contre la diffusion de ces bactéries, afin que les mesures d'hygiène spécifiques soient appliquées le plus rapidement possible. Notre équipe a testé les performances de plusieurs kits commerciaux permettant la détection rapide des EPC (**publication n°10**).

Publication n°1

Boutet-Dubois A, Pantel A, Prère MF, Bellon O, Brieu-Roche N, Lecaillon E, Le Coustumier A, Davin-Regli A, Villeneuve L, Bouziges N, Gleize E, Lamarca R, Dunyach-Remy C, Sotto A, Lavigne JP. Faecal carriage of oxyiminocephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae* among paediatric units in different hospitals in the south of France.
Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2013 Aug;32(8):1063-8.

Faecal carriage of oxyiminocephalosporin-resistant Enterobacteriaceae among paediatric units in different hospitals in the south of France

A. Boutet-Dubois · A. Pantel · M.-F. Prère · O. Bellon ·
N. Brieu-Roche · E. Lecaillon · A. Le Coustumier ·
A. Davin-Regli · L. Villeneuve · N. Bouziges · E. Gleize ·
R. Lamarca · C. Dunyach-Remy · A. Sotto ·
J.-P. Lavigne

Received: 13 January 2013 / Accepted: 26 February 2013 / Published online: 15 March 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract The aim of this study was to determine the presence of oxyiminocephalosporin-resistant (OCR) Gram-negative bacilli and extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing isolates in stool specimens obtained from paediatric patients hospitalised for acute diarrhoea. We conducted a prospective, multicentre study over a period of 6 months in seven hospitals in the south of France. Samplings were carried out from infants admitted for acute diarrhoea with no previous antibiotic treatment in the last week. Bacteria in stool specimens were screened for the presence of OCR Gram-negative bacilli on Drigalski agar supplemented with ceftazidime and

ESBL CHROMagar® media, and confirmed by the Rosco tablets test. Genetic detection was performed by the Check MDR® microarray and by polymerase chain reaction (PCR) and sequencing with bacterial DNA extracted from isolates. The presence of OCR enterobacteria was markedly high (177/1,118 patients, 15.2 %), with an important community origin (66.1 %). The majority of multidrug-resistant (MDR) bacteria were *Enterobacter cloacae* (106, 59.9 %) and *Escherichia coli* (61, 34.5 %). The prevalence of ESBL and CTX-M producers represented 5.2 and 4.3 % of the isolates, respectively. The main proportion of these ESBL carriers was

This manuscript was presented at the 31st Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI), Paris, France, December 2011.

A. Boutet-Dubois · A. Pantel · N. Bouziges · C. Dunyach-Remy ·
A. Sotto · J.-P. Lavigne (✉)
Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1047,
Université Montpellier 1, UFR de Médecine,
186 Chemin du Carreau des Lanes, CS83021,
30908 Nîmes Cedex 01, France
e-mail: jean.philippe.lavigne@chu-nîmes.fr

A. Boutet-Dubois · A. Pantel · N. Bouziges · J.-P. Lavigne
Laboratoire de Bactériologie, CHU Carémieu,
30029 Nîmes Cedex 09, France

M.-F. Prère
Laboratoire de Bactériologie-Hygiène, CHU Purpan,
31059 Toulouse Cedex 9, France

O. Bellon · N. Brieu-Roche
Laboratoire de Diagnostic Biologique des Maladies Infectieuses
et d'Hygiène, Centre Hospitalier du Pays d'Aix,
13616 Aix-en-Provence Cedex 1, France

E. Lecaillon
Laboratoire de Biologie Polyvalente,
Centre Hospitalier Saint Jean,
66046 Perpignan, France

A. Le Coustumier
Laboratoire de Biologie,
Centre Hospitalier Jean Rougier,
46005 Cahors Cedex 9, France

A. Davin-Regli · L. Villeneuve
Laboratoire de Biologie,
Centre Hospitalier Edmond Garcin,
13677 Aubagne, France

E. Gleize · R. Lamarca
Laboratoire d'Analyses Médicales,
Centre Hospitalier de Narbonne,
11108 Narbonne, France

found in children less than 1 year of age (53.4 %). One carbapenemase (IMP-1) was detected. The study revealed the wide dissemination of MDR bacteria in infants attending hospitals in the south of France during a non-outbreak situation, in particular, the spread of cefotaximase and the detection of a carbapenemase. This worrisome situation must reinforce the use of hygiene procedures and appropriate antibiotics to control the emergence and spread of OCR organisms.

Introduction

The potential of different antimicrobial agents to cause the emergence of multidrug resistance in the normal digestive microflora is of great importance. The diffusion of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) is worrisome [1]. More recently, the misuse of antibiotics has led to the emergence of other multidrug-resistant (MDR) bacteria, notably, carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. Targeted surveillance of high-risk patients is essential to prevent outbreaks [2]. Indeed, this prevalence can be related to the increase in faecal carriers over time [3, 4]. To date, few studies have reported the prevalence of MDR bacteria among children [5–12]. The aim of this work was to evaluate the prevalence of oxyiminocephalosporin-resistant (OCR) enterobacteria in children hospitalised for acute diarrhoea.

Patients and methods

Study design and data collection

From November 2010 to April 2011, faecal samples from children hospitalised for acute diarrhoea in neonates and paediatrics departments in seven hospitals in the south of France (University Hospitals of Nîmes and Toulouse; General Hospitals of Aix-en-Provence, Aubagne, Cahors, Narbonne and Perpignan) were prospectively and consecutively collected. Sampling was carried out among children with acute diarrhoea and no previous antibiotic treatment in the last week during a non-outbreak period on the first day of hospitalization. The following clinical data were collected prospectively: demographic data, clinical ward, hospitalisation or surgical treatment in the last 12 months and transfer from another hospital or intensive care unit, and previous antibiotic treatment in the last 3 months. Children were deemed to be of community origin when they had never been hospitalised.

All the parents of the infants included in the study were informed of the protocol and accepted the research. The study was proposed to our local ethical committee (South Mediterranean III). The committee judged that no consent was needed in this study as the stool was not additional; this sample is systematic in diarrhoea.

Screening for OCR isolates

To screen for OCR Gram-negative bacilli, samples were placed in 1 mL sterile 0.9 % saline and then vortexed. From this suspension, 100 μ L was inoculated on two culture media: two culture media were inoculated [Drigalski agar supplemented with ceftazidime (2 mg/L) and a chromogenic agar ESBL CHROMagar® (CHROMagar, France)]. Plates were incubated at 37 °C under aerobic conditions and assessed after 24 and 48 h of incubation. For the commercial media, the colour and intensity of the colonies were recorded according to the colour chart provided by the manufacturer.

Strain identification and antimicrobial susceptibility testing

The VITEK 2 automated system (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) and the disk diffusion method were used for the biochemical identification and antibiotic susceptibility testing of all isolates that grew on the two media pathogens, respectively. The following antibiotics were tested: amoxicillin, amoxicillin + clavulanic acid, ticarcillin, ticarcillin + clavulanic acid, piperacillin, piperacillin + tazobactam, cefepime, cefazolin, cefotaxime, ceftazidime, ceftiofur, imipenem, ertapenem, meropenem and aztreonam. Strains were classified as antibiotic-sensitive, -intermediately resistant, or -resistant, according to the recommendations of the Antibiogram Committee of the French Society for Microbiology (<http://www.sfm-microbiologie.org>).

To be retained in the study, enterobacteria should be resistant to oxyiminocephalosporins and *Pseudomonas aeruginosa* resistant to ceftazidime. ESBL and derepressed AmpC were detected by a combination of disk tests (NeoSensitabs tablets, ESBL + AmpC Screen Kit and ESBL Confirm ID Kit, Rosco Diagnostica) using the association between cefotaxime, ceftazidime, and clavulanic acid and cloxacillin. The results were interpreted following the manufacturer's recommendations.

Characterisation of β -lactamases resistance genes

Plasmid or chromosomal DNA was extracted from the isolates using the EZ1 DNA Tissue Kit on the BioRobot EZ1 extraction platform (Qiagen, Courtaboeuf, France). The genotypic characterisation of multidrug resistance mechanisms was determined by the Check-MDR CT102 microarray (Biocentrics, France) targeting ESBLs (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} and *bla*_{CTX-M}) and carbapenemases (*bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} and *bla*_{NDM-1}) [13]. After detection, polymerase chain reaction (PCR) assays targeting the corresponding *bla* genes were performed and identified by sequencing the PCR products [14, 15]. We used a triplex PCR specific for the CTX-M-15-producing *Escherichia coli* O25b:H4-ST131 clone [16]. The detection of *ampC* promoter/attenuator

mutation in *E. coli* isolates and plasmid-mediated *ampC* genes in different suspected strains were performed by using PCR and sequencing [17, 18].

Results

Main characteristics of patients

A total of 1,118 stool specimens, one specimen for each hospitalised child, were examined. The characteristics of the study population are presented in Table 1. The repartition of the study population was: 55.4 % of male, with a median age of 1 year (range 0–16 years), 588 (52.6 %) infants were aged less than 1 year, 405 (36.2 %) were between 1 and 6 years of age, and 125 (11.2 %) more than 6 years old. Of the 1,118 children, 177 (15.2 %) harboured OCR enterobacteria. Moreover, 55 children harboured ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Single OCR isolates were identified in 151 patients, and two and three different MDR microorganisms were found in 23 and 3 patients, respectively.

Repartition of OCR strains

OCR isolates corresponded mostly to *E. cloacae* strains (106, 59.9 % of the OCR strains) and *E. coli* (61, 34.5 %). The prevalence of ESBL was 5.2 %, with 4.3 % CTX-M, 0.5 % SHV and 0.4 % TEM producers. The distribution of the different types of ESBL in the different centres is shown in Tables 1 and 2 and Fig. 1. Among the CTX-M producers, 36 (76.6 %) strains produced CTX-M-15 β -lactamases, mainly *E. coli*

strains (31, 86.1 %). Only one strain among the 31 CTX-M-15-producing strains belonged to the *E. coli* O25b:H4-ST131 clone. TEM- and SHV-producing strains were equally prevalent in *E. cloacae* (45.5 % of the strains) and *E. coli* (54.5 % of the strains). No other species produced ESBL enzymes. One case (0.08 %) of carbapenemase carriage (IMP-1) was detected. Finally, we observed a very high amount of chromosomally AmpC derepressed carriage (10.2 %). No plasmid-mediated AmpC isolate was detected. In *E. coli* strains, *ampC* promoter/attenuator mutations were observed. These mutations concerned both promoter [at position -42: (C→T)] and attenuator [+32 (G→A) and +58 (C→T)], leading to increased expression of the chromosomal *ampC* gene.

Discussion

This prospective multisite study highlights the high faecal carriage of MDR bacteria in young children hospitalised for acute diarrhoea in seven French hospitals in the south of France, notably, the great importance of CTX-M β -lactamases and the emergence of a carbapenemase. This high level of faecal carriage of OCR is a surprising finding, considering the proportion of infants (53 % of all the included children), the studied population (children with acute diarrhoea at admission to hospital) and the high proportion (73 %) of community origin encountered. We observed that 38 % and 53.4 % of the OCR and ESBL carriers were less than 1 year old and 74.3 % of the ESBL carriers have never been hospitalised. Moreover, all the ESBL carriers were less than 1 year old and 96 % of all these carriers have never had

Table 1 Demographic characteristics of the study population and distribution of oxyiminocephalosporin-resistant (OCR) enterobacteria

Characteristics	ESBL carriers <i>n</i> =58	AmpC carriers <i>n</i> =118	Carbapenemase carrier <i>n</i> =1	Total <i>n</i> =1118
Age (range)	0 (0–10)	1.5 (0–16)	7	1 (0–16)
<1 year	31 (53.4)	36 (30.5)	–	588 (52.6)
Between 1 and 6 years	25 (43.1)	73 (61.9)	–	405 (36.2)
>6 years	2 (3.4)	9 (7.6)	1	125 (11.2)
Male/female, <i>n</i> (%)	32 (55.2)/26 (44.8)	68 (57.6)/50 (42.4)	1/0	619 (55.4)/499 (44.6)
Previous hospitalisation or lived in an institution in the last year	15 (25.9)	45 (38.1)	1	299 (26.7)
Distribution of OCR isolates				
Toulouse (<i>n</i> =405)	23	49	–	72 (17.8)
Perpignan (<i>n</i> =158)	10	25	–	35 (22.2)
Aix en Provence (<i>n</i> =217)	5	27	–	32 (14.7)
Nîmes (<i>n</i> =152)	10	10	–	20 (13.2)
Aubagne (<i>n</i> =134)	4	4	1	9 (6.7)
Cahors (<i>n</i> =30)	6	1	–	7 (23.3)
Narbonne (<i>n</i> =22)	–	2	–	2 (9.1)

Table 2 Oxyiminocephalosporin-resistant (OCR) Gram-negative bacilli recovered from stool specimens

Strains	Number	ESBL ^a						Carbapenemases IMP-1	Hyperproduction of AmpC
		CTX-M-15	CTX-M-14	TEM-24	TEM-19	SHV-4	SHV-5		
<i>E. cloacae</i>	106 (45.7)	5	3	3	—	1	2	1	91
<i>E. coli</i>	61 (26.3)	31	8	1	1	—	3	—	17
<i>P. aeruginosa</i>	55 (23.7)	—	—	—	—	—	—	—	55
<i>C. koseri</i>	6 (2.6)	—	—	—	—	—	—	—	6
<i>E. aerogenes</i>	4 (1.7)	—	—	—	—	—	—	—	4
Total enterobacteria	177 (76.3)	36	11	4	1	1	5	1	118
Total	232 (100)	36	11	4	1	1	5	1	173

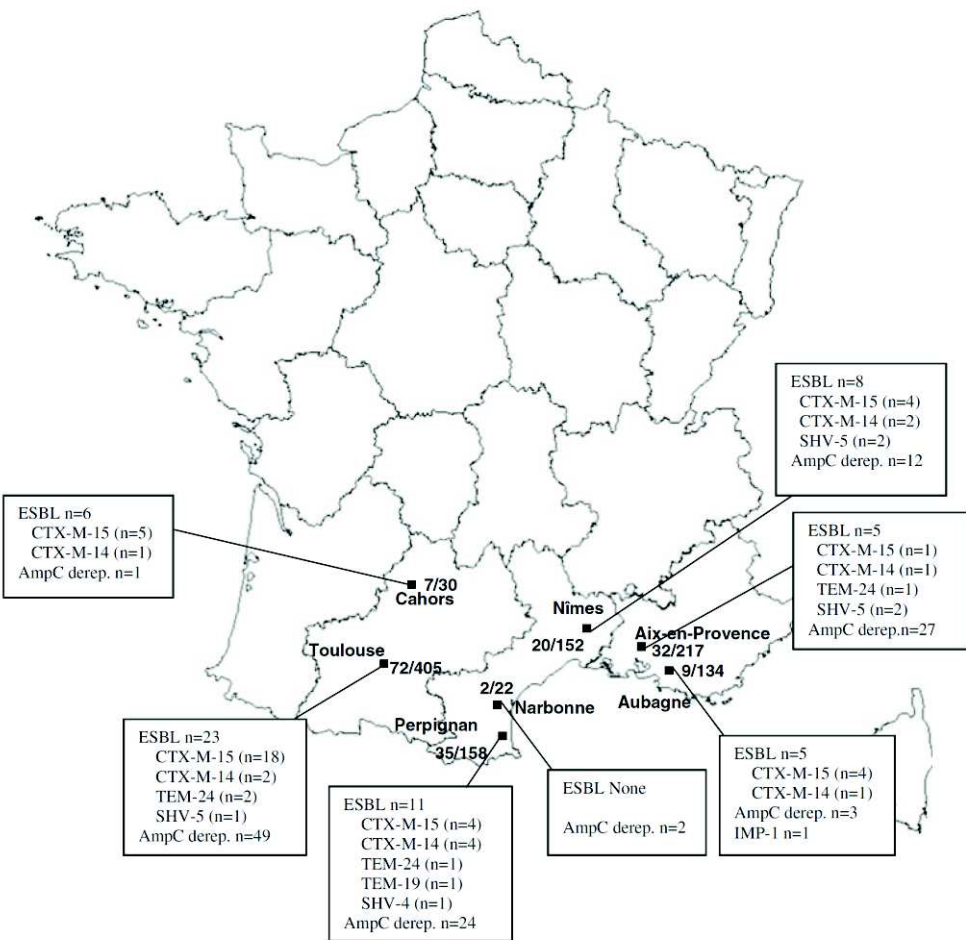
^a ESBL Extended spectrum β-lactamase

antibiotic exposure, respectively. In this young population, the worldwide *E. coli* O25b:H4-ST131 clone was detected in one case (a community acquisition), showing a weak spread of this strain in the community (no antibiotic exposure was recorded in the last 3 months).

The main prevalence of OCR faecal carriage is between 1 and 6 years (54.2 %); this was due to the carriage of

AmpC derepressed strains. Different studies have previously reported the prevalence of faecal carriage of ESBL-producing isolates and highlighted that the community could be a reservoir of these organisms [7–12]. Marked regional variations were observed in the incidence and genotype of these strains. The prevalence was low in European countries (1.1 to 3 %) [7–9] compared to other parts of the

Fig. 1 Distribution of multidrug-resistant (MDR) and extended-spectrum β-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae strains described in the seven hospitals in the south of France



world (21 to 58 %) [5–12]. The only previous French study in a paediatric unit showed that the prevalence of the MDR bacteria was 4.2 % in 2009 with 2.1 % of ESBL carriers [8]. Our study demonstrated an expansion of the resistant bacteria that could be explained by the differences in settings. In neonates, infections/colonisations due to MDR strains are classically associated with preterm low birth weight, prolonged mechanical ventilation, prior use and duration of antibiotic treatment (notably third-generation cephalosporins and aminoglycosides), and invasive devices [19]. The outcome of the infants was not associated with mortality [20]. This worrisome situation was increased by the detection of one case (0.08 %) of carbapenemase carriage (IMP-1) in a 7-year-old child who had multiple hospitalisations and received different courses of antibiotic treatment during these indwellings. This metallo- β -lactamase IMP was detected in our previous study, confirming its low but real circulation in France [21].

Finally, we observed a very high amount of chromosomally AmpC derepressed carriage (10.2 %). A great number of infants (69.5 %) carrying these strains have previously received previously courses of antibiotics treatment during the last 3 months. This level confirms a problem in antibiotic use explaining this resistance. Interestingly, in *E. coli* strains, we observed some known mutations necessary to convert the weak promoter of *ampC* to the strongest promoter consensus sequence. In the same way, 55 children harboured ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Very few studies have reported prevalence in this population: this prevalence varied between 6 and 57 % [22, 23]. Antibiotics ineffective against *P. aeruginosa* significantly increased the risk of colonisation [24]. We observed this trend in our population, with a majority of children (54.5 %) having previous hospitalisations and antibiotic courses. Even if the study described colonisation, we could not exclude the consequence of this emergence in the infection situation, inducing very restricted antimicrobial treatment options.

Conclusion

The results of this multicentre study are worrying. Basic hygiene (strict compliance to hand washing to prevent cross-transmission in hospitals, but also in the community, nurseries and schools) must be reinforced, risk factors for the acquisition of these strains must be detected and the elective pressure, on account of antibiotics misuse, should be discouraged.

Acknowledgements We thank CHROMagar for providing the media and Rosco Diagnostica for providing the tablets.

This work was supported by the National Institute of Health and Medical Research (INSERM).

Conflict of interest The authors report no conflicting interests.

References

1. Nicolas-Chanoine MH, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso MP, Caniça MM, Park YJ, Lavigne JP, Pitout J, Johnson JR (2008) Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother* 61:273–281
2. Lucet JC, Decré D, Fichelle A, Joly-Guillou ML, Pemet M, Deblangy C, Kosmann MJ, Régnier B (1999) Control of a prolonged outbreak of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in a university hospital. *Clin Infect Dis* 29:1411–1418
3. Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, Coque TM (2008) Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect* 14:144–153
4. Sasaki T, Hirai I, Niki M, Nakamura T, Komalamisra C, Maipanich W, Kusolsuk T, Sa-Nguankiat S, Pubampen S, Yamamoto Y (2010) High prevalence of CTX-M β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in stool specimens obtained from healthy individuals in Thailand. *J Antimicrob Chemother* 65:666–668
5. Lo WU, Ho PL, Chow KH, Lai EL, Yeung F, Chiu SS (2010) Fecal carriage of CTXM type extended-spectrum β -lactamase-producing organisms by children and their household contacts. *J Infect* 60:286–292
6. Andriatahina T, Randrianirina F, Hariniana ER, Talarmin A, Raobijaona H, Buisson Y, Richard V (2010) High prevalence of fecal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric unit in Madagascar. *BMC Infect Dis* 10:204
7. Strömdahl H, Tham J, Melander E, Walder M, Edquist PJ, Odenholt I (2011) Prevalence of faecal ESBL carriage in the community and in a hospital setting in a county of Southern Sweden. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 30:1159–1162
8. Janvier F, Mérens A, Delaune D, Soler C, Cavallo JD (2011) Fecal carriage of third-generation cephalosporins-resistant Enterobacteriaceae in asymptomatic young adults: evolution between 1999 and 2009. *Pathol Biol (Paris)* 59:97–101
9. Millar MR, Walsh TR, Linton CJ, Zhang S, Leeming JP, Bennett PM; ALSPAC Study Team. Avon Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood (2001) Carriage of antibiotic-resistant bacteria by healthy children. *J Antimicrob Chemother* 47:605–610
10. Souza TB, Morais MB, Tahan S, Melli LC, Rodrigues MS, Scaletsky IC (2009) High prevalence of antimicrobial drug-resistant diarrheagenic *Escherichia coli* in asymptomatic children living in an urban slum. *J Infect* 59:247–251
11. Woerther PL, Angebault C, Jacquier H, Hugede HC, Janssens AC, Sayadi S, El Mniai A, Armand-Lefèvre L, Ruppé E, Barbier F, Raskine L, Page AL, de Rekeneire N, Andremont A (2011) Massive increase, spread, and exchange of extended spectrum β -lactamase-encoding genes among intestinal Enterobacteriaceae in hospitalized children with severe acute malnutrition in Niger. *Clin Infect Dis* 53:677–685
12. Ho PL, Wong RC, Chow KH, Yip K, Wong SS, Que TL (2008) CTX-M type β -lactamases among fecal *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in non-hospitalized children and adults. *J Microbiol Immunol Infect* 41:428–432
13. Naas T, Cuzon G, Bogaerts P, Glupczynski Y, Nordmann P (2011) Evaluation of a DNA microarray (Check-MDR CT102) for rapid detection of TEM, SHV, and CTX-M extended-spectrum β -lactamases and of KPC, OXA-48, VIM, IMP, and NDM-1 carbapenemases. *J Clin Microbiol* 49:1608–1613
14. Pitout JD, Hanson ND, Church DL, Laupland KB (2004) Population-based laboratory surveillance for *Escherichia coli*-producing extended-spectrum beta-lactamases: importance of community isolates with *bla*_{CTX-M} genes. *Clin Infect Dis* 38:1736–1741

15. Moland ES, Hanson ND, Black JA, Hossain A, Song W, Thomson KS (2006) Prevalence of newer beta-lactamases in Gram-negative clinical isolates collected in the United States from 2001 to 2002. *J Clin Microbiol* 44:3318–3324
16. Blanco M, Alonso MP, Nicolas-Chanoine MH, Dahbi G, Mora A, Blanco JE, López C, Cortés P, Llagostera M, Leflon-Guibout V, Puentes B, Mamani R, Herrera A, Coira MA, García-Garrote F, Pita JM, Blanco J (2009) Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases in Lugo (Spain): dissemination of clone O25b:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother* 63:1135–1141
17. Pérez-Pérez FJ, Hanson ND (2002) Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 40:2153–2162
18. Corvec S, Prodhomme A, Giraudeau C, Dauvergne S, Reynaud A, Caroff N (2007) Most *Escherichia coli* strains overproducing chromosomal AmpC β -lactamase belong to phylogenetic group A. *J Antimicrob Chemother* 60:872–876
19. Singh N, Patel KM, Léger MM, Short B, Sprague BM, Kalu N, Campos JM (2002) Risk of resistant infections with Enterobacteriaceae in hospitalized neonates. *Pediatr Infect Dis J* 21:1029–1033
20. Chiu S, Huang YC, Lien RI, Chou YH, Lin TY (2005) Clinical features of nosocomial infections by extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in neonatal intensive care units. *Acta Paediatr* 94:1644–1649
21. Vidal-Navarro L, Pfeiffer C, Bouziges N, Sotto A, Lavigne JP (2010) Faecal carriage of multidrug-resistant Gram-negative bacilli during a non-outbreak situation in a French university hospital. *J Antimicrob Chemother* 65:2455–2458
22. Yoshioka H, Fujita K, Maruyama S (1983) Faecal carriage of *Pseudomonas aeruginosa* in newborn infants. *J Hosp Infect* 4:41–44
23. Cooke EM, Shooter RA, O'Farrell SM, Martin DR (1970) Faecal carriage of *Pseudomonas aeruginosa* by newborn babies. *Lancet* 2:1045–1046
24. Thuong M, Arvaniti K, Ruimy R, de la Salmonière P, Scanvic-Hameg A, Lucet JC, Régnier B (2003) Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* and risk factors for carriage acquisition in an intensive care unit. *J Hosp Infect* 53:274–282

Publication n°2

Pantel A, Boutet-Dubois A, Jean-Pierre H, Marchandin H, Sotto A, Lavigne JP; CARB-LR group. French regional surveillance program of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli: results from a 2-year period.

Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014 Dec;33(12):2285-92.

French regional surveillance program of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli: results from a 2-year period

A. Pantel · A. Boutet-Dubois · H. Jean-Pierre ·
H. Marchandin · A. Sotto · J.-P. Lavigne · on behalf
of the CARB-LR group

Received: 14 April 2014 / Accepted: 12 June 2014 / Published online: 19 July 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract In February 2011, the CARB-LR group was created as a sentinel laboratory-based surveillance network to control the emergence of carbapenem-resistant Gram-negative bacilli (CR GNB) in a French Southern Region. We report the epidemiological results of a 2-year study. All the

CARB-LR group: Fabrice Amiel (Bioaxiome, Nîmes), Jeremy Bayette (Biomed34, St Thibéry), Brigitte Compan (Laboratoire de Bactériologie, CHU Arnaud de Villeneuve, Montpellier), Jean-Marie Courrège (Laboratoire Polyvalent, CH Bagnols-sur-Cèze), Marie-Noëlle Didelot-Rousseau (Laboratoire de Bactériologie, CHU Arnaud de Villeneuve, Montpellier), Anne Gaschet (Laboratoire de Biologie Polyvalente, Hôpital St Jean, Perpignan), Sylvain Godreuil (Laboratoire de Bactériologie, CHU Arnaud de Villeneuve, Montpellier), Brigitte Lamy (Laboratoire de Bactériologie, CHU Arnaud de Villeneuve, Montpellier), Anne-Laure Michon (Laboratoire de Bactériologie, CHU Arnaud de Villeneuve, Montpellier), Pierre Mion (LaboSud OC Biologie, Montpellier), Eugénie Mirouse (LaboSud OC Biologie, Béziers), Isabelle Pagès (LaboSud OC Biologie, Montpellier), Jocelyne Paillisson (LaboSud OC Biologie, Montpellier), Rémy Fournier (LaboSud OC Biologie, Montpellier), Bruno Poirey (Unibio, Nîmes).

A. Pantel · J.-P. Lavigne (✉) · on behalf of the CARB-LR group
Service de Microbiologie, CHU Carémieu, Place du Professeur
Robert Debré, Nîmes Cedex 09 30029, France
e-mail: jphlavigne@hotmail.com

A. Pantel · A. Boutet-Dubois · A. Sotto · J.-P. Lavigne
Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1047,
Université Montpellier 1, Nîmes, France

A. Boutet-Dubois
Laboratoire de Biologie Polyvalente, CH Alès-Cévennes, Alès,
France

H. Jean-Pierre · H. Marchandin
Laboratoire de Bactériologie, CHU Arnaud de Villeneuve,
Montpellier, France

A. Sotto
Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, CHU Carémieu,
Nîmes, France

Gram-negative bacilli isolates detected in the different labs (hospital and community settings) of a French Southern Region and with reduced susceptibility to ertapenem and/or imipenem were characterised with regard to antibiotic resistance, *bla* genes content, repetitive sequence-based polymerase chain reaction (rep-PCR) profiles and multilocus sequence typing (MLST). A total of 221 strains were analysed. *Acinetobacter baumannii* was the most prevalent carbapenemase-producing bacteria, with a majority of OXA-23 producers ($n=37$). One isolate co-produced OXA-23 and OXA-58 enzymes. *Klebsiella pneumoniae* was the most frequent carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) (OXA-48 producer: $n=29$, KPC producer: $n=1$), followed by *Escherichia coli* (OXA-48 producer: $n=8$, KPC producer: $n=1$) and *Enterobacter cloacae* (OXA-48 producer, $n=1$). One isolate of *Pseudomonas aeruginosa* produced a VIM-1 carbapenemase. A clonal diversity of carbapenemase-producing *K. pneumoniae* and *E. coli* was noted with different MLSTs. On the other hand, almost all OXA-23-producing *A. baumannii* strains belonged to the widespread ST2/ international clone II. The link between the detection of CR GNB and a foreign country was less obvious, suggesting the beginning of a local cross-transmission. The number of CR GNB cases in our French Southern Region has sharply increased very recently due to the diffusion of OXA-48 producers.

Introduction

Carbapenems are master keys for managing infections due to multidrug-resistant (MDR) Gram-negative bacilli. The emergence and spread of acquired resistance to carbapenem antibiotics, particularly among Enterobacteriaceae and *Acinetobacter* spp., are a threatening public health concern

worldwide. In many countries, including those in Europe, carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) strains have been reported due to plasmid-borne hydrolysing enzymes [1]. Although their hydrolysis spectrum may vary, carbapenemases can hydrolyse nearly all β -lactam molecules. Additional frequent occurrence of resistance to other drugs severely limits treatment options and CPE infections are associated with an increased risk of mortality [2].

In Europe, carbapenemase-producing bacteria have spread dramatically and are now endemic in several countries, such as Greece and Italy [3]. In France, CPE are uncommon. All the episodes are notified to the French Institute for Public Health Surveillance (Institut de Veille Sanitaire, InVS) (<http://www.invs.sante.fr>). To improve the detection and prevent the dissemination of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli, expert laboratories located in main regions have been appointed to carry out microbiological investigations. Since 1st February 2011, the Department of Bacteriology at Nîmes University Hospital has been designated as the referent for the Languedoc-Roussillon region. This region, located in the South of France, is among the cross-roads between Europe and North Africa.

The present study aimed to quantify and describe the carbapenem-resistant Gram-negative bacilli (CR GNB) and CPE isolates from February 2011 to February 2013 in this region.

Materials and methods

Bacterial isolates and data collection

The CARB-LR group is a surveillance network built in the Languedoc-Roussillon region. This region is located in the South of France, including around 4 % of the French population (2.6 million inhabitants). The network concerns the two University Hospitals, the seven Regional Hospitals and the private labs. The study was initiated on 1st February 2011 and carried out until 31st January 2013. The strains isolated during this period were preserved in deep agar gel in each centre and sent to the Department of Bacteriology at Nîmes University Hospital. The inclusion criteria concerned all the Gram-negative bacilli non-susceptible to selected carbapenems (ertapenem and/or imipenem). For the purposes of this study, isolates with intermediate and resistant profiles were defined as non-susceptible. For each included strain, we documented the patients' demographic characteristics, clinical ward, number of infected or colonised patients, site of infection/colonisation, number of reported deaths, existence of an epidemiological link between the index case and a foreign country, name of this country and the nature of the link (previous stay or hospitalisation abroad within one year of

hospitalisation in France). Patients were deemed to have community disease if the first culture found positive for carbapenemase-producing strains was obtained within 48 h of admission. For patients from whom several isolates had been obtained, only the first isolate was considered.

Identification and susceptibility testing

Bacterial genus and species were identified by the Vitek 2 automated system (bioMérieux, La Balme-les-Grottes, France). Antimicrobial susceptibility was determined by the disk diffusion method according to recommendations of the Antibiotic Committee of the French Society for Microbiology (CA-SFM) (<http://www.sfm-microbiologie.org>). In addition, the Etest method (bioMérieux) was used to determine the susceptibility to the four carbapenems (ertapenem, imipenem, meropenem, doripenem). For *Proteus* spp., *Morganella morganii* and *Providencia* spp., intrinsically less susceptible to imipenem, only ertapenem, meropenem and/or doripenem minimum inhibitory concentrations (MICs) were considered. For *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp., intrinsically resistant to ertapenem, only imipenem, meropenem and/or doripenem MICs were considered. The results were interpreted following the CA-SFM criteria. The non-susceptibility to the carbapenems was assessed according to the MIC: ertapenem >0.5 mg/L, imipenem >2 mg/L, meropenem >2 mg/L and doripenem >1 mg/L.

Characterisation of β -lactamase-encoding genes

Plasmid or chromosomal DNA was extracted from the isolates using the EZ1 DNA Tissue Kit on the BioRobot EZ1 extraction platform (QIAGEN, Courtaboeuf, France). For Enterobacteriaceae and *P. aeruginosa*, the genotypic characterisation of β -lactam resistance mechanisms was determined by the Check-MDR CT102 microarray (Biocentrics, France) targeting genes coding for the most clinically prevalent carbapenemases (*bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} and *bla*_{NDM-1}) and extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} and *bla*_{CTX-M}). This microarray is capable of differentiating ESBLs or AmpC producers resistant to carbapenems by porin deficiency from true carbapenemase producers [4]. A multiplex polymerase chain reaction (PCR) was used for the detection of the six plasmid-carried *bla*_{AmpC} genes [5]. For *A. baumannii*, fragments of *bla*_{OXA} alleles encoding each of the three sub-groups of acquired OXA carbapenemases and the *bla*_{OXA-51}-like alleles intrinsic to this species were amplified using the multiplex PCR assay previously developed by Woodford et al. [6]. For all carbapenemases detected, the amplified genes were sequenced using specific primers [6, 7].

Clonality analysis

For carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *A. baumannii*, the genetic relationship was studied by the DiversiLab system (bioMérieux), a semi-automated fingerprinting tool based on repetitive sequence-based PCR (rep-PCR), by following the manufacturer's instructions. Isolates with identical strain patterns were considered indistinguishable if the similarity percentage was ≥ 95 %.

Multilocus sequence typing (MLST) analysis was also performed using the three MLST schemes of Institute Pasteur, publicly available from the MLST website at <http://www.pasteur.fr/mlst>.

Results

Number of isolates and resistance mechanisms

During the 2-year period of study, 278 isolates were analysed (Fig. 1). After MICs measurement, 221 (79 %) CR GNB isolates were definitively studied due to a resistance to at least one carbapenem.

Among Enterobacteriaceae, 151 (68 %) strains were analysed. The main mechanism of resistance was the combination of impermeability with derepressed AmpC (63 %, $n=95$, including 24 ESBL-positive strains). Carbapenemase production was the second mechanism of resistance (21 %, $n=32$), followed by impermeability associated with a unique ESBL production (11 %, $n=17$) or acquisition of plasmidic

AmpC (5 %, $n=7$) (Table 1). Overall, *Enterobacter* spp. accounted for 58 % (87/151) of the carbapenem-resistant enterobacteria but only one *E. cloacae* was confirmed as CPE (this isolate produced the *bla*_{OXA-48} gene). The other main *Enterobacter* spp. strains (99 %, 86/87) combined derepressed AmpC (including 21 ESBL-positive strains) with impermeability caused by porin loss. On the other hand, *K. pneumoniae* was the most often encountered CPE species (69 %, 22/32 CPE), followed by *E. coli* (28 %, $n=9$) and *E. cloacae* (3 %, $n=1$). The estimated prevalence of CPE in our region was 0.12 % (32/26,534). OXA-48 was the most frequent carbapenemase in Languedoc-Roussillon (94 %, $n=30$). No derivative of OXA-48, such as OXA-181 or OXA-163, was found. Twenty-one OXA-48-producing *K. pneumoniae* (61 % of the carbapenem-non-susceptible *K. pneumoniae* isolates) were reported, mainly associated with the acquisition of ESBL CTX-M group 1 (90 %, $n=19$). Eight OXA-48-producing *E. coli* were identified. Only one of them produced ESBL. Two isolates were KPC-2 producers (6 %): *K. pneumoniae* ($n=1$) and *E. coli* ($n=1$). Finally, seven acquired AmpC isolates were detected to be associated with impermeability: six *K. pneumoniae* DHA-1 and one *E. coli* CMY-2-like.

Among *A. baumannii*, 40 CR GNB isolates were collected. Thirty-six (90 %) produced an OXA-23 enzyme, in addition to the constitutive OXA-51. OXA-58 and OXA-23 were determined as co-existent in one isolate. The estimated prevalence of carbapenemase-producing *A. baumannii* was 9.4 % (37/392) in the concerned centres. Research of other genes coding for MBL or KPC enzymes was negative for the three other strains.

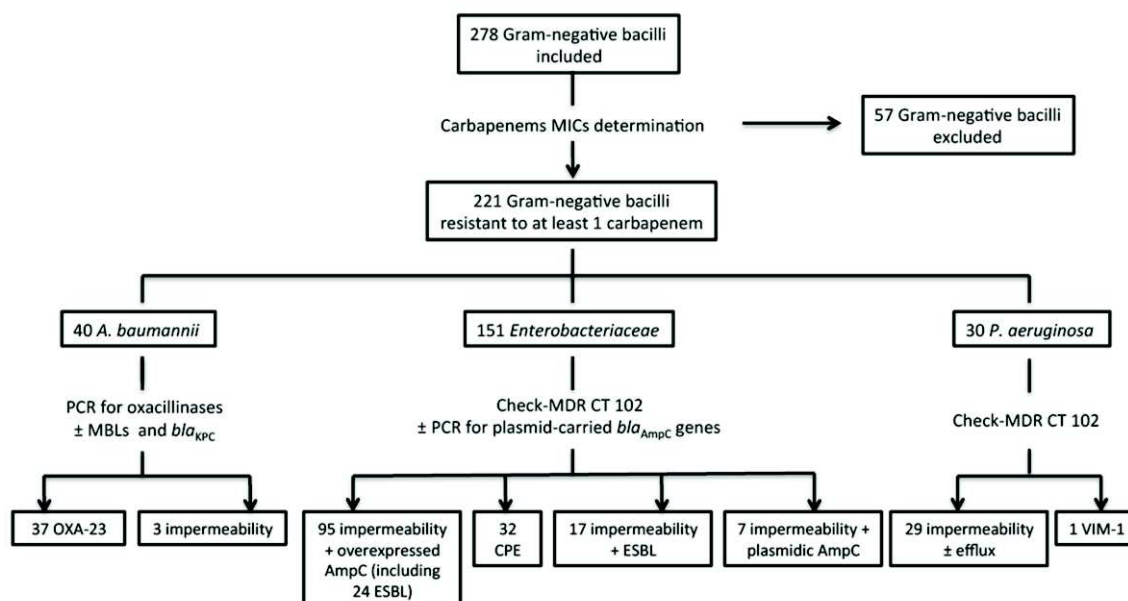


Fig. 1 Strategy used for the identification of carbapenemase-producing bacteria among the strains referred to the regional reference centre (Languedoc-Roussillon, France) over a period of 2 years (2011–2013)

Table 1 Carbapenem-resistant Gram-negative bacilli (CR GNB) isolated in the Languedoc-Roussillon region (France) over a period of 2 years (2011–2013)

Species	Carbapenemases (n=70)				Impermeability associated with (n=151)				
	OXA-48	KPC	OXA-23	VIM	Overproduced AmpC	Overproduced AmpC+ESBL	ESBL	Acquired AmpC	Alone
Enterobacteriaceae (n=151)									
<i>E. cloacae</i> (n=71)	1 (1 %)	–	–	–	53 (75 %)	17 (24 %)	–	–	–
<i>K. pneumoniae</i> (n=34)	21 (61 %)	1 (3 %)	–	–	–	–	6 (18 %)	6 (18 %)	–
<i>E. coli</i> (n=26)	8 (31 %)	1 (4 %)	–	–	5 (19 %)	3 (11 %)	8 (31 %)	1 (4 %)	–
<i>E. aerogenes</i> (n=16)	–	–	–	–	12 (75 %)	4 (25 %)	–	–	–
<i>K. oxytoca</i> (n=2)	–	–	–	–	–	–	2 (100 %)	–	–
<i>P. mirabilis</i> (n=1)	–	–	–	–	–	–	1 (100 %)	–	–
<i>P. mirabilis</i> (n=1)	–	–	–	–	–	–	1 (100 %)	–	–
<i>H. alvei</i> (n=1)	–	–	–	–	1 (100 %)	–	–	–	–
<i>A. baumannii</i> (n=40)	–	–	37 (93 %)	–	–	–	–	–	3 (7 %)
<i>P. aeruginosa</i> (n=30)	–	–	–	1 (3 %)	–	–	–	–	29 (97 %)
Total	30 (13.6 %)	2 (0.9 %)	37 (16.7 %)	1 (0.4 %)	71 (32.1 %)	24 (10.9 %)	17 (7.7 %)	7 (3.2 %)	32 (14.5 %)

Among *P. aeruginosa*, 30 CR GNB isolates were received. Only one produced a VIM-1 carbapenemase.

Clonality analysis

The rep-PCR connected multiple alerts concerning OXA-48-producing *K. pneumoniae* (Fig. 2a). ST101 was the most prevalent clone showing an important epidemiogenic potential (43 %, n=9). ST15 was also frequent (28 %, n=6), followed by ST395 (14 %, n=3), ST405 (10 %, n=2) and ST17 (5 %, n=1). In contrast, OXA-48-producing *E. coli* isolates corresponded to different episodes and belonged to diverse STs: ST472 (n=2), ST32 (n=1), ST66 (n=1), ST88 (n=1), ST132 (n=1), ST350 (n=1) and ST473 (n=1) (Fig. 2b).

The KPC-2-producing *K. pneumoniae* isolate belonged to ST37 and the *E. coli* isolate belonged to ST398.

Concerning the *A. baumannii* isolates, the majority of the OXA-23-producing strains appeared genetically very close by rep-PCR typing (95 %, n=35). They belonged to ST2. One strain of ST2 was clearly unrelated. The isolate producing both OXA-58 and OXA-23 enzymes belonged to ST253.

Epidemiological description of the episodes

From 1st February 2011 to 31 January 2013, 32 CPE cases were identified, corresponding to 19 episodes. The first CPE episode (three cases) occurred in March 2011 in Montpellier University Hospital. In May 2011, three other cases corresponding to distinct episodes occurred in Montpellier and Perpignan Hospitals (Fig. 3). For one year, the number of CPE identified remained close to zero in Languedoc-Roussillon until the second part of 2012, when a trend to increase can be observed. Indeed, in May 2012 to January 2013, 25 CPE cases were identified, corresponding to 14 episodes. The 32 CPE cases were collected from different laboratories of Languedoc-Roussillon: Montpellier University Hospital (72 %, n=23), private laboratories from Montpellier (16 %, n=5), Perpignan Hospital (6 %, n=2), Sète Hospital (3 %, n=1) and Bagnols-sur-Cèze Hospital (3 %, n=1) (Fig. 4). Among the 19 CPE episodes, 10 (53 %) were associated with cross-border transfers: five repatriation or hospitalisation of patients out of France in the year preceding the isolation of the CPE, and five travel to or living outside of France. The other nine episodes were considered as nosocomial acquisition. The origin countries were Morocco (47 % of the episodes, n=9, corresponding to OXA-48-producing *K. pneumoniae* and *E. coli*) and Luxembourg (5 %, n=1, corresponding to the KPC-producing *K. pneumoniae*). Ten cases concerned strains isolated by screening for repatriated patients (10/32; 31.3 %).

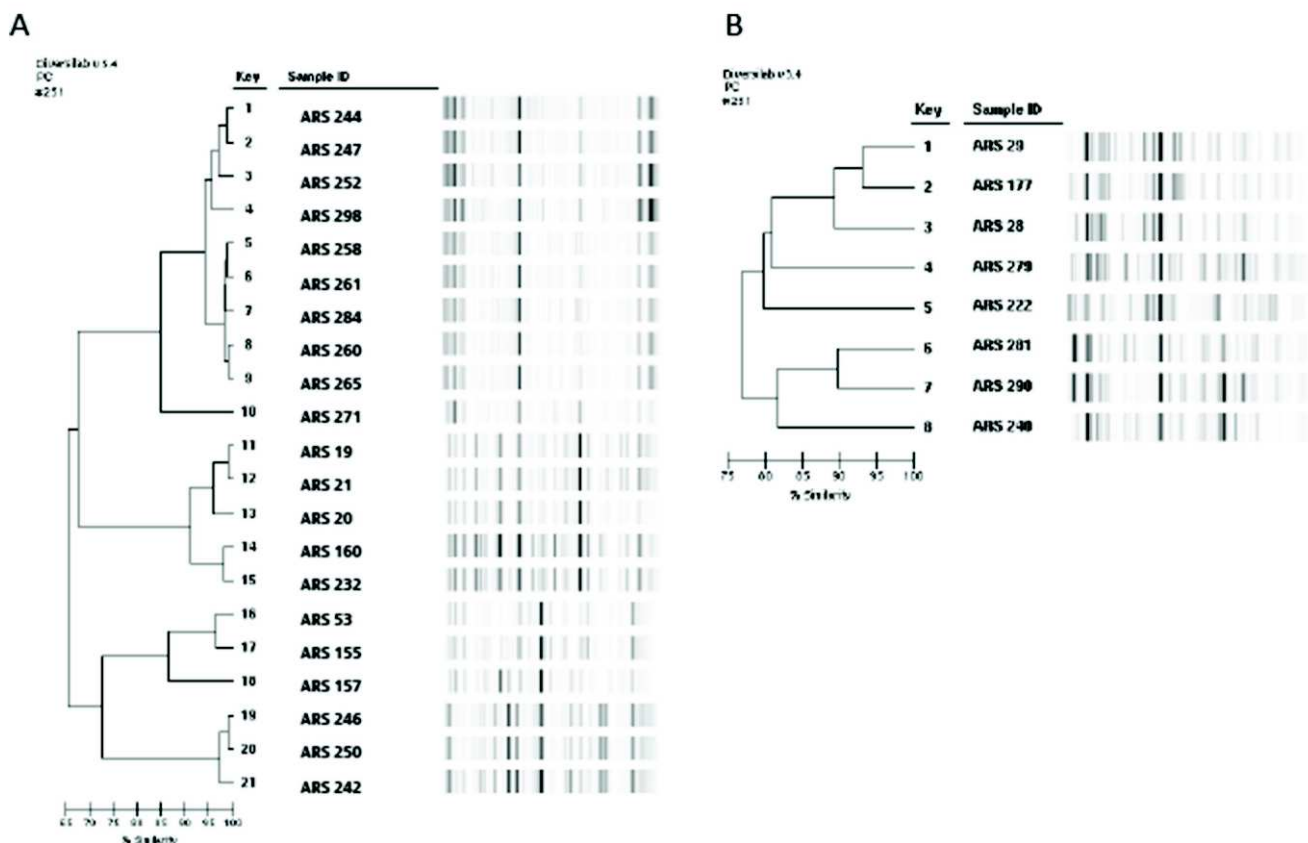


Fig. 2 Dendrogram of repetitive sequence-based polymerase chain reaction (rep-PCR) and multilocus sequence typing (MLST) showing the clonal diversity among OXA-48 producers referred to the regional

reference centre (Languedoc-Roussillon, France). **a** OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* ($n=21$) and **b** OXA-48-producing *Escherichia coli* ($n=8$)

Among the 32 CPE cases, 19 (59 %) were infected at least at one site. The main isolation site was the urinary tract (37 %, $n=7$), followed by the lower respiratory tract (26 %, $n=5$), bloodstream (11 %, $n=2$), skin or soft tissue (11 %, $n=2$), the abdominal tract (5 %, $n=1$), placenta (5 %, $n=1$) and bone (5 %, $n=1$). The 13 other CPE were isolated from colonisation (rectal swab). Four patients were colonised or infected by two OXA-48-positive strains isolated from two species: *K. pneumoniae* and *E. coli*. Different units have been involved. Medicine units (41 %, $n=13$) and intensive care units (ICUs) (28 %, $n=9$) were the two wards with the highest number of CPE isolates, followed by rehabilitation units (19 %, $n=6$), surgery (6 %, $n=2$), maternity (3 %, $n=1$) and emergency (3 %, $n=1$). Two patients (6.3 %) died after isolation of their CPE isolate: one patient was infected by an OXA-48-producing *K. pneumoniae* (ARS160) and one patient was infected with a KPC-producing *E. coli* (ARS 224). Death was not attributed directly to the infection.

Unlike CPE, during the 2 years of study, no significant variation was observed for the OXA-23-producing *A. baumannii*, with 0 to 4 strains isolated by month (Fig. 3). The 37 strains were provided by Nîmes University Hospital

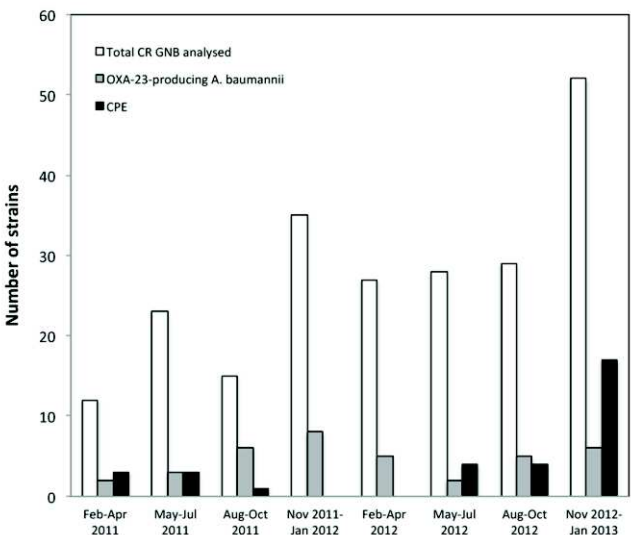


Fig. 3 Monthly number of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii* referred to the regional reference centre (Languedoc-Roussillon, France) over a period of 2 years (2011–2013). CR GNB carbapenem-resistant Gram-negative bacilli; CPE carbapenemase-producing Enterobacteriaceae

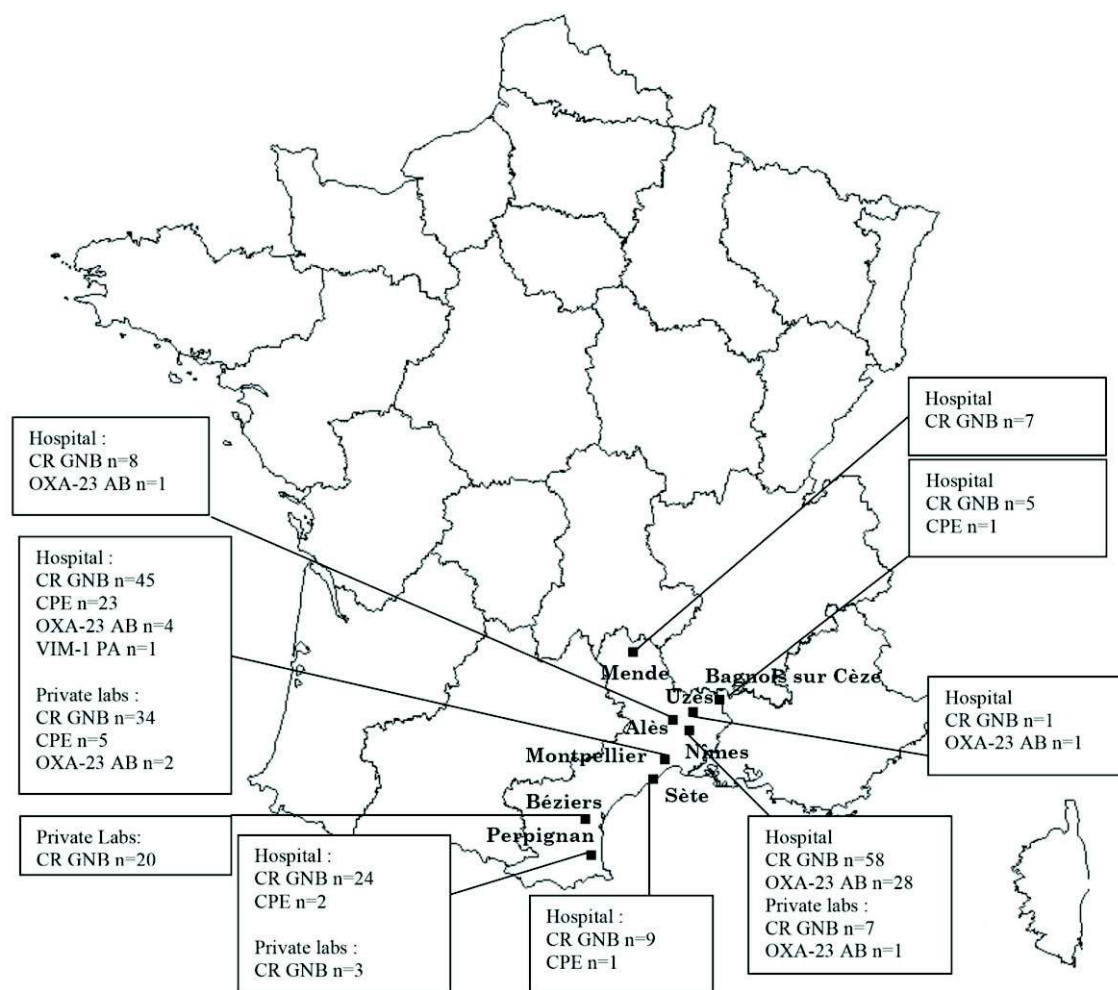


Fig. 4 Distribution of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* referred to the regional reference centre (Languedoc-Roussillon, France) over a period

of 2 years (2011–2013). CR GNB carbapenem-resistant Gram-negative bacilli; CPE carbapenemase-producing Enterobacteriaceae; AB *Acinetobacter baumannii*; PA *Pseudomonas aeruginosa*

(75 %, $n=28$), Montpellier University Hospital (11 %, $n=4$), private laboratories of Montpellier (5 %, $n=2$), Alès Hospital (3 %, $n=1$), Uzès Hospital (3 %, $n=1$) and private laboratories of Nîmes (3 %, $n=1$). Strains were isolated in several sites: the urinary tract (59 %, $n=22$), the digestive tract (22 %, $n=8$), the lower respiratory tract (8 %, $n=3$), central venous catheter (5 %, $n=2$), skin and soft tissue (3 %, $n=1$) and bone (3 %, $n=1$). Patients harbouring OXA-23-producing *A. baumannii* were hospitalised in rehabilitation units (49 %, $n=18$), medicine units (27 %, $n=10$), ICUs (21 %, $n=8$) and surgery (3 %, $n=1$). For 35 cases, no history of travel or hospitalisation in a foreign country was reported and nosocomial transmission was suggested. Only two cases were associated with cross-border transfers: one from Algeria (OXA-23 producer) and one from Indonesia (OXA-23 and OXA-58 producer). To our knowledge, no death has been attributed to the infection by CR GNB.

Discussion

After 2 years of monitoring of CR GNB, the main mechanism involved in resistance to carbapenems in Enterobacteriaceae was impermeability, always coupled with chromosomal or plasmidic AmpC overexpression, or acquisition of ESBLs that have a trace carbapenem-hydrolysing activity [8]. This trend is new and not extensively reported. Nevertheless, the identification of CPE in our region seems to be more and more frequent, with a notable increase in the number of cases, especially involving *K. pneumoniae*, during the 2 years of study. The enzymes identified were mostly OXA-48 (94 %) and rarely KPC-2 (6 %). In contrast to national data, no NDM were identified [9, 10]. In *K. pneumoniae*, carbapenemase was almost exclusively associated with ESBL. This combination with an ESBL was rarely found in *E. coli*, where phenotypic diagnosis is often difficult and can lead to omissions.

Several clones delineated by MLST analysis in this study were previously reported. For *K. pneumoniae*, ST101 was described as OXA-48 producers, especially in Morocco, Tunisia, Finland, the UK and Spain [9, 11–13]. ST15 was previously associated with the spread of CTX-M-15 in central Europe [14] but also with VIM-producing *K. pneumoniae* in Spain [15] and OXA-48-producing *K. pneumoniae* in Finland [12]. ST395 and ST405 *K. pneumoniae* were widely described in European outbreaks involving strains from North Africa [9, 16] and ST17 was recently associated with OXA-181 variant in Asia [17]. Among OXA-48-producing *E. coli*, no global epidemiological clone such as ST38 [12, 18] or ST131 [13] was identified. Only *E. coli* ST88 was previously associated with OXA-48 production in the UK [13]. This study underlines once again the role of Morocco in the dissemination of CPE in France, since half of the patients colonised or infected by OXA-48 producers had travelled to this country. Indeed, OXA-48 producers are widespread in Morocco since their first identification in 2010 [19, 20] and have generated several outbreaks in many European countries [1, 9]. However, dramatically, more and more cases do not seem to have any link with a foreign country, suggesting the lack of detection of the true index cases in most instances and the beginning of a local cross-transmission.

In addition to successful clones, the spread of *bla*_{OXA-48} genes seems to be also linked to the successful spread of pOXA-48a, since four patients have been colonised or infected by two different species of CPE (*K. pneumoniae* the first and *E. coli* the second time). Indeed, in this IncL/M-type plasmid, the insertion of Tn1999 into a gene encoding a transfer inhibition protein is responsible for the high transfer frequency of pOXA-48a [21]. Also, in addition to nosocomial transmission through species like *K. pneumoniae* or *Enterobacter* spp., the risk of a community-acquired infection involving *E. coli* is real.

Despite the proximity of Italy, where KPC producers are endemic [1, 22], only two strains were isolated in this study. The first KPC-2-producing *K. pneumoniae* described in our region does not belong to the worldwide clone ST258 but to ST37, a sequence type previously reported in Italy and Croatia [22, 23]. The strain was isolated in a patient hospitalised earlier in an ICU of Luxembourg, a country where no report of CPE was noted. The KPC-2-producing *E. coli* belonged to ST398, a clone previously associated with ESBL production in Israel and Tunisia [24, 25].

In contrast to this clonal diversity of CPE, repartition of *A. baumannii* was less dispersed. As previously described in European countries [26, 27], the OXA-58 and OXA-24 producers have been replaced by OXA-23 producers. In Languedoc-Roussillon, almost all OXA-23-producing *A. baumannii* strains belonged to the widespread ST2/ international clone II [28] and were mainly associated with hospitalisations in long-stay units. Interestingly, we found, for

the first time to our knowledge, a strain co-producing OXA-23 and OXA-58. This strain was identified in the urine sample of a patient with no previous hospitalisation but who had travelled to Indonesia.

Finally, most carbapenem-resistant *P. aeruginosa* did not produce carbapenemases. The only one that did harboured the metallo- β -lactamase VIM-1, previously described in our country [29].

Conclusion

In conclusion, this study highlights, for the first time, the emergence of carbapenem-resistant Gram-negative bacilli (CR GNB) in the South of France in a cross-roads region between Europe and North Africa. This attests the serious worldwide problem of multidrug-resistant (MDR) Gram-negative bacilli strains. National recommendations suggest the screening of all patients who came from a foreign country and were hospitalised in this country (<http://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=372>). These recommendations are not closely followed in hospitals (http://sf2h.net/sf2h/sf2h_bulletin-mars2013.pdf). We observed the same trend in our region. Screening must be reinforced in the hospital units, especially ICUs or surgery. Even if CPE are not endemic in our region, the absence of screening sampling and the selection pressure may contribute to their spread, as known with the worldwide spread of ESBL producers. A rapid diffusion of CPE is a real threat, notably in the community. Efforts should be made to more closely control the antibiotic use and the detection of these MDR strains.

Acknowledgements INSERM U1047 is supported by INSERM and Université de Montpellier 1.

Conflict of interest The authors report no conflicting interests.

References

1. Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, Livermore DM, Miriagou V, Naas T, Rossolini GM, Samuelsen Ø, Seifert H, Woodford N, Nordmann P; European Network on Carbapenemases (2012) Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. Clin Microbiol Infect 18:413–431
2. Schwaber MJ, Klarfeld-Lidji S, Navon-Venezia S, Schwartz D, Leavitt A, Carmeli Y (2008) Predictors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* acquisition among hospitalized adults and effect of acquisition on mortality. Antimicrob Agents Chemother 52:1028–1033
3. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2012) Antimicrobial resistance surveillance in Europe. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). ECDC, Stockholm. Available online at:

- <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2012.pdf>
4. Naas T, Cuzon G, Bogaerts P, Glupczynski Y, Nordmann P (2011) Evaluation of a DNA microarray (Check-MDR CT102) for rapid detection of TEM, SHV, and CTX-M extended-spectrum beta-lactamases and of KPC, OXA-48, VIM, IMP, and NDM-1 carbapenemases. *J Clin Microbiol* 49:1608–1613
 5. Pérez-Pérez FJ, Hanson ND (2002) Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 40:2153–2162
 6. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, Amyes SG, Livermore DM (2006) Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents* 27:351–353
 7. Poirel L, Walsh TR, Cuivillier V, Nordmann P (2011) Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 70:119–123
 8. Chia JH, Su LH, Lee MH, Kuo AJ, Shih NY, Siu LK, Wu TL (2010) Development of high-level carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* among patients with prolonged hospitalization and carbapenem exposure. *Microb Drug Resist* 16:317–325
 9. Potron A, Poirel L, Rondinaud E, Nordmann P (2013) Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae over a 11-year period, 2001 to 2011. *Euro Surveill* 18. pii: 20549
 10. Vaux S, Carbonne A, Thiolet JM, Jarlier V, Coignard B; RAISIN and Expert Laboratories Groups (2011) Emergence of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in France, 2004 to 2011. *Euro Surveill* 16. pii: 19880
 11. Pitart C, Solé M, Roca I, Fàbrega A, Vila J, Marco F (2011) First outbreak of a plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing OXA-48 beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 55:4398–4401
 12. Österblad M, Kirveskari J, Hakanen AJ, Tissari P, Vaara M, Jalava J (2012) Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Finland: the first years (2008–11). *J Antimicrob Chemother* 67:2860–2864
 13. Dimou V, Dhanji H, Pike R, Livermore DM, Woodford N (2012) Characterization of Enterobacteriaceae producing OXA-48-like carbapenemases in the UK. *J Antimicrob Chemother* 67:1660–1665
 14. Damjanova I, Tóth A, Pászti J, Hajbel-Vékony G, Jakab M, Berta J, Milch H, Füzi M (2008) Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Hungary in 2005—the new ‘MRSAs’? *J Antimicrob Chemother* 62: 978–985
 15. Sánchez-Romero I, Asensio A, Oteo J, Muñoz-Algarra M, Isidoro B, Vindel A, Alvarez-Avello J, Balandín-Moreno B, Cuevas O, Fernández-Romero S, Azañedo L, Sáez D, Campos J (2012) Nosocomial outbreak of VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates of multilocus sequence type 15: molecular basis, clinical risk factors, and outcome. *Antimicrob Agents Chemother* 56:420–427
 16. Potron A, Kalpoe J, Poirel L, Nordmann P (2011) European dissemination of a single OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* clone. *Clin Microbiol Infect* 17:E24–E26
 17. Balm MN, Ngan G, Jureen R, Lin RT, Teo JW (2013) OXA-181-producing *Klebsiella pneumoniae* establishing in Singapore. *BMC Infect Dis* 13:58
 18. Poirel L, Bemabeu S, Fortineau N, Podglajen I, Lawrence C, Nordmann P (2011) Emergence of OXA-48-producing *Escherichia coli* clone ST38 in France. *Antimicrob Agents Chemother* 55:4937–4938
 19. Benouda A, Touzani O, Khairallah MT, Araj GF, Matar GM (2010) First detection of oxacillinase-mediated resistance to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* from Morocco. *Ann Trop Med Parasitol* 104: 327–330
 20. Hays C, Benouda A, Poirel L, Elouennass M, Nordmann P (2012) Nosocomial occurrence of OXA-48-producing enterobacterial isolates in a Moroccan hospital. *Int J Antimicrob Agents* 39:545–547
 21. Potron A, Poirel L, Nordmann P (2014) Derepressed transfer properties leading to the efficient spread of the plasmid encoding carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother* 58:467–471
 22. Richter SN, Frasson I, Franchin E, Bergo C, Lavezzo E, Barzon L, Cavallaro A, Palù G (2012) KPC-mediated resistance in *Klebsiella pneumoniae* in two hospitals in Padua, Italy, June 2009–December 2011: massive spreading of a KPC-3-encoding plasmid and involvement of non-intensive care units. *Gut Pathog* 4:7
 23. Bedenić B, Mazzariol A, Plečko V, Bošnjak Z, Barić P, Vraneš J, Cornaglia G (2012) First report of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Croatia. *J Chemother* 24:237–239
 24. Izdebski R, Baraniak A, Fiett J, Adler A, Kazma M, Salomon J, Lawrence C, Rossini A, Salvia A, Vidal Samsó J, Fierro J, Paul M, Lerman Y, Malhotra-Kumar S, Lammens C, Goossens H, Hryniewicz W, Brun-Buisson C, Carmeli Y, Gniadkowski M; MOSAR WP2 and WP5 Study Groups (2013) Clonal structure, extended-spectrum beta-lactamases, and acquired AmpC-type cephalosporinases of *Escherichia coli* populations colonizing patients in rehabilitation centers in four countries. *Antimicrob Agents Chemother* 57:309–316
 25. Ben Sallem R, Ben Slama K, Estepa V, Jouini A, Gharsa H, Klibi N, Sáenz Y, Ruiz-Larrea F, Boudabous A, Torres C (2012) Prevalence and characterisation of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolates in healthy volunteers in Tunisia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31:1511–1516
 26. Minandri F, D’Arezzo S, Antunes LC, Pourcel C, Principe L, Petrosillo N, Visca P (2012) Evidence of diversity among epidemiologically related carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* strains belonging to international clonal lineage II. *J Clin Microbiol* 50:590–597
 27. Liakopoulos A, Miriagou V, Katsifas EA, Karagouni AD, Daikos GL, Tzouveleakis LS, Petinaki E (2012) Identification of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* in Greece, 2010 to 2011. *Euro Surveill* 17. pii: 20117
 28. Saule M, Samuelsen Ø, Dumpis U, Sundsfjord A, Karlson A, Balode A, Miklaševics E, Karah N (2013) Dissemination of a carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strain belonging to international clone II/sequence type 2 and harboring a novel AbaR4-like resistance island in Latvia. *Antimicrob Agents Chemother* 57: 1069–1072
 29. Corvec S, Poirel L, Decousser JW, Allouch PY, Drugeon H, Nordmann P (2006) Emergence of carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase VIM-1 in *Pseudomonas aeruginosa* isolates in France. *Clin Microbiol Infect* 12:941–942

Publication n°3

Pantel A, Marchandin H, Prère MF, Boutet-Dubois A, Brieu-Roche N, Gaschet A, Davin-Regli A, Sotto A, Lavigne JP. Faecal carriage of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli in hospital settings in southern France.

Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015 May;34(5):899-904.

Faecal carriage of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli in hospital settings in southern France

A. Pantel · H. Marchandin · M.-F. Prère · A. Boutet-Dubois ·
N. Brieu-Roche · A. Gaschet · A. Davin-Regli · A. Sotto ·
J.-P. Lavigne

Received: 12 October 2014 / Accepted: 7 December 2014 / Published online: 23 December 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract The emergence of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli is a worldwide problem. To date, no study has evaluated the prevalence of faecal carriage of carbapenemase-producing and carbapenem-resistant Gram-negative bacilli (CR GNB) in France. From 1 February to 30 April 2012, we conducted a prospective, multicentre study in three University Hospitals and four General Hospitals in the south of France. The carriage of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) and other CR GNB was screened by both cultivation on chromID® CARBA and chromID® OXA-48 media (bioMérieux) and molecular tools [multiplex polymerase chain reaction (PCR) and NucliSENS EasyQ® KPC (bioMérieux)]. The genetic relationship between isolates was assessed by rep-PCR (DiversiLab, bioMérieux) or

multilocus sequence typing (MLST). The prevalences of CR GNB and carbapenemase-producing bacteria were 2.4 % (27/1,135) and 0.4 % ($n=5$), respectively. Two strains corresponded to OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* and belonged to the widespread sequence type (ST) 2/international clone II, whereas one strain was an ST15 OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae*. Two OXA-48-producers were detected exclusively by PCR. This first French study revealed the very low dissemination of carbapenemase-producing bacteria in patients attending hospitals in southern France during a non-outbreak situation. However, the increasing description of epidemic cases in this area must reinforce the use of hygiene procedures to prevent diffusion of these multidrug-resistant microorganisms.

This study was partially presented at the 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Berlin, Germany, April 2013.

A. Pantel · J.-P. Lavigne (✉)
Service de Microbiologie, CHU Carémieu, Place du Professeur
Robert Debré, Nîmes, France
e-mail: jphlavigne@hotmail.com

A. Pantel · A. Boutet-Dubois · A. Sotto · J.-P. Lavigne
Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1047,
Université Montpellier 1, Nîmes, France

H. Marchandin
Laboratoire de Bactériologie, CHU Arnaud de Villeneuve,
Montpellier, France

M.-F. Prère
Laboratoire de Bactériologie-Hygiène, CHU Purpan, Toulouse,
France

A. Boutet-Dubois
Laboratoire de Biologie Polyvalente, CH Alès-Cévennes, Alès,
France

N. Brieu-Roche
Laboratoire de Biologie Polyvalente, CH du Pays d'Aix,
Aix-en-Provence, France

A. Gaschet
Laboratoire de Biologie Polyvalente, CH Saint-Jean, Perpignan,
France

A. Davin-Regli
Laboratoire de Biologie Polyvalente, CH Edmond Garcin, Aubagne,
France

A. Sotto
Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, CHU Carémieu,
Nîmes, France

Introduction

Carbapenem-resistant Gram-negative bacilli (CR GNB) isolates have been increasingly reported throughout the world [1]. The main bacteria harbouring this resistance are *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. and members of the family Enterobacteriaceae. Different mechanisms are involved in carbapenem resistance: (i) selective impermeability or efflux, especially in *P. aeruginosa*, (ii) reduced outer membrane permeability in combination with production of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) or overproduction of AmpC β -lactamase, especially in Enterobacteriaceae, and (iii) production of carbapenemase, e.g. OXA-48-, KPC- or NDM-producers in Enterobacteriaceae and OXA-23-, IMP-, VIM- or GES-producers in non-fermenters. The emergence of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) has become a major public health concern, notably in Mediterranean countries [2]. To limit the propagation of these multidrug-resistant bacteria, French national recommendations suggest the screening of all patients who came from a foreign country and were hospitalised in this country (<http://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=372>).

If different publications allow to map the countries where CPE have emerged, very few data on the faecal carriage of these isolates are available [3–6]. The aim of the present study was to determine the prevalence of faecal carriage of CR GNB in patients hospitalised or consulting in the south of France during a non-outbreak period.

Materials and methods

Data collection and bacterial isolates

A bioMérieux collection of 202 strains [33 OXA-48-producing Enterobacteriaceae, four OXA-181-producing Enterobacteriaceae, 35 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, 36 ESBL-producing Enterobacteriaceae, 14 carbapenem-resistant Enterobacteriaceae by impermeability, 10 non-fermentative Gram-negative bacilli, 14 vancomycin-resistant enterococci and 56 wild-type strains (12 Enterobacteriaceae, eight *Candida* spp., four *Staphylococcus aureus*, three *Enterococcus* spp., 11 *A. baumannii*, 11 *P. aeruginosa*, seven *Stenotrophomonas maltophilia*)] was used to validate the screening media [7].

From 1st February to 30th April 2012, faecal samples from patients hospitalised or consulting in seven hospitals in southern France (University Hospitals of Montpellier, Nîmes and Toulouse; General Hospitals of Aix-en-Provence, Alès, Aubagne and Perpignan) were prospectively and consecutively collected. Sampling was carried out among stools submitted for the detection of enteropathogens or rectal swab performed to screen multidrug-resistant enteric bacteria on the first day of

hospitalisation and without antibiotic treatment. Redundant samples were excluded. The following clinical data were collected prospectively: demographic data, clinical ward, previous hospitalisation in the last 12 months and length of the current stay. Specimens were conserved at -20°C and sent to Nîmes University Hospital at the end of inclusion.

Screening methods

To validate the selective chromogenic media [chromID[®] CARBA and chromID[®] OXA-48 (bioMérieux, La Balmeles-Grottes, France)], we inoculated by streaking per plate a low inoculum (10^3 CFU) for OXA-48-producing Enterobacteriaceae and a high inoculum (10^6 CFU) for all the other strains. Plates were incubated at 37°C under aerobic conditions and assessed after 24 and 48 h of incubation. The colour and intensity of the colonies were recorded according to the colour chart provided by the manufacturer.

To screen for CR GNB, samples were placed in 1 mL sterile 0.9 % NaCl solution and then vortexed. From this suspension, 100 μL were plated on two selective chromogenic culture media performed to identify CPE, chromID[®] CARBA and chromID[®] OXA-48 [8]. Plates were incubated at 37°C under aerobic conditions and assessed after 18, 24 and 48 h of incubation. The colour and intensity of the colonies were recorded according to the colour chart provided by the manufacturer.

In parallel, we used molecular biology tools to screen stools. Plasmid and chromosomal DNA was extracted from the clinical specimens using the NucliSENS[®] easyMAG system (bioMérieux) with onboard lysis. For *bla*_{KPC} screening, the NucliSENS EasyQ[®] KPC assay (bioMérieux) was performed according to the manufacturer's instructions. For Enterobacteriaceae and *P. aeruginosa*, the genotypic characterisation was determined by multiplex polymerase chain reaction (PCR) assays targeting *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{NDM-like}, *bla*_{IMP-like} and *bla*_{VIM-like} genes on sample extracts [9]. For *A. baumannii*, fragments of *bla*_{OXA} alleles were amplified using a specific multiplex PCR assay [10]. All PCR products were identified by sequencing [9, 10].

Strain identification and antimicrobial susceptibility testing

The Vitek 2 automated system (bioMérieux) was used for the biochemical identification of all isolates growing on the two commercial media. Antimicrobial susceptibility was determined by the disc diffusion method according to recommendations of the AntibioGram Committee of the French Society for Microbiology (<http://www.sfm-microbiologie.org>). The Etest method (bioMérieux) was used to determine the susceptibility to the four carbapenems (ertapenem, imipenem, meropenem and doripenem).

Characterisation of carbapenemase-encoding genes in bacterial isolates

Plasmid and chromosomal DNA was extracted from the isolates of screening media using the EZ1 DNA Tissue Kit on the BioRobot EZ1 extraction platform (Qiagen, Courtaboeuf, France). The same multiplex PCRs used for screening and sequencing were performed [9, 10].

Clonality analysis

For OXA-23-producing *A. baumannii* isolates, the genetic relationship was studied using the DiversiLab system (bioMérieux), a semi-automated fingerprinting tool based on repetitive sequence-based PCR (rep-PCR), by following the manufacturer's instructions. Isolates with identical strain patterns were considered to be clonally related when the similarity percentage was ≥ 95 %. Multilocus sequence typing (MLST) was carried out for the CPE isolates according to the Institut Pasteur's MLST scheme (<http://www.pasteur.fr/mlst>).

Results

Validation of screening chromogenic media

All strains tested were detected at 18 h of incubation on the chromID[®] OXA-48 medium. The sensitivity of this medium is 99 %, despite the low inoculum. The specificity of detection of OXA-48-producing Enterobacteriaceae with chromID[®] OXA-48 is 92 % at 18 h; 98 % of the non-OXA-48-producing Enterobacteriaceae strains tested are negative. The two false-positive strains growing on the medium were IMP-producing *Serratiamarcescens* and a vancomycin-resistant *Enterococcusfaecium*.

Concerning the chromID[®] CARBA medium, the sensitivity and specificity are 68 and 95.5 %, respectively. The sensitivity is 97 % if we exclude the OXA-48-producing strains as recommended by the manufacturer.

The combination of chromID[®] OXA-48 and chromID[®] CARBA allows 99 % detection of CPE with 95 % specificity at 18 h. The false-positive results are mainly due to the growth of vancomycin-resistant *E. faecium* and strains resistant to carbapenem by impermeability on chromID[®] CARBA.

Main characteristics of the patients

A total of 1,135 specimens (1,074 stools and 61 rectal swabs) were collected during the 3-month study period. The repartition of the study population was 57 % males and the median age was 48 years (range 0–94). Of the 1,135 patients, 420

(37 %) had a previous hospitalisation or lived in a nursing home or a healthcare centre in the last year. The studied population belonged to the following wards: paediatrics (33 %, $n=375$), internal medicine (27 %, $n=306$), geriatrics (20 %, $n=227$), surgical units (7 %, $n=79$), intensive care units (7 %, $n=80$), emergency (3 %, $n=34$) and recovery units (3 %, $n=34$).

Prevalence and identification of CR GNB

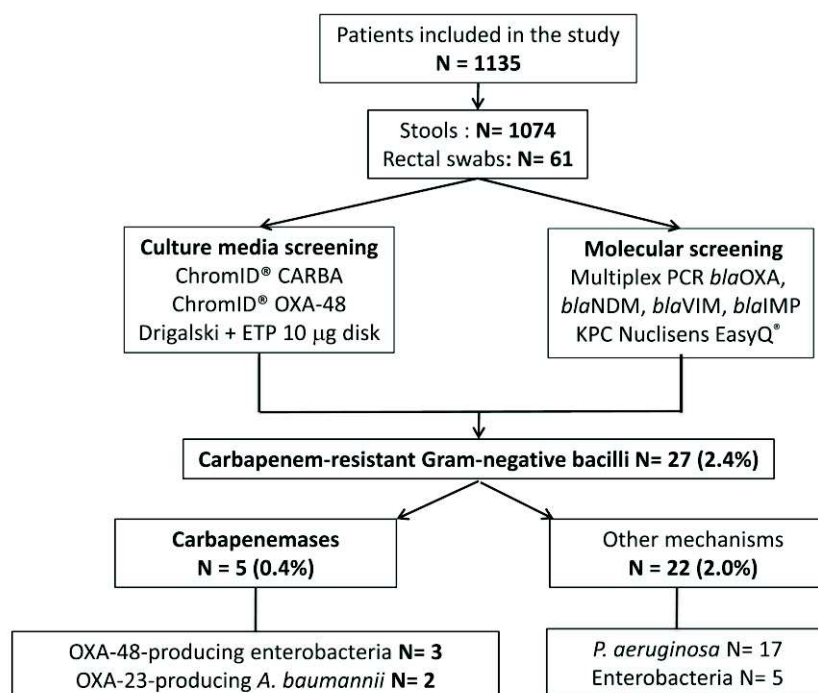
Of the 1,135 patients, 27 (2.4 %) harboured CR GNB isolates (Fig. 1). Species identified were *P.aeruginosa* (1.5 %, $n=17$), Enterobacteriaceae (0.7 %, $n=8$) and *A.baumannii* (0.2 %, $n=2$). The prevalence of carbapenemase-producing bacteria was 0.4 % ($n=5$). Two strains corresponded to OXA-23-producing *A.baumannii* (0.2 %) and one strain to OXA-48-producing *Klebsiellapneumoniae* (0.1 %) (Table 1). Based on the molecular screening, we detected two other *bla*_{OXA-48}-positive samples. Repeated cultures of these positive PCR stools on the two chromogenic media and a Drigalski agar with ertapenem disc failed to identify the corresponding *bla*_{OXA-48}-producing bacterium. Finally, we also found *Enterobacter* spp. and *Escherichia coli* with reduced outer membrane permeability in combination with overproduction of AmpC β -lactamase (0.3 %, $n=3$).

Despite the low prevalence of digestive carriage of CPE in our population, the two media showed excellent specificities: 98.7 % for chromID[®] OXA-48 and 95.5 % for chromID[®] CARBA.

MLST and characteristics of patients colonised by CPE or carbapenemase-producing *A. baumannii*

The OXA-48-producing *K. pneumoniae* strain isolated during this study belonged to sequence type (ST) 15 (Table 1). It was detected in stools from a man hospitalised at Nîmes University Hospital and with a history of hospitalisation in Morocco. The two *bla*_{OXA-48} PCR-positive samples were obtained from children hospitalised in the same paediatric unit at Toulouse University Hospital. They had no history of hospitalisation in the year before the screening and no contact with a foreign country. Concerning the *A. baumannii* isolates, the two OXA-23-producing strains isolated at Nîmes Hospital appeared to be genetically very close by rep-PCR typing (≥ 95 % similarity). They belonged to ST2. They were isolated from male patients with a long-term hospitalisation in geriatric and rehabilitation wards, respectively. In the five cases, no isolation precautions and contact screening have been prescribed while the diagnostic was after the hospitalisation. However, no other case was observed. Moreover, no clinical signs could be noted in the five carriers during the hospital stay.

Fig. 1 Flow chart showing the dissemination of the study population



Discussion

The emergence and global spread of CPE and carbapenem-resistant *A. baumannii* are of great concern to healthcare facilities worldwide [1]. The Mediterranean region is of interest due to a great diversity and population mixing. In this area, the prevalence of carbapenemases is particularly high, with this area constituting one of the most important reservoirs [1]. In France, episodes involving CPE remained uncommon until 2010 [11]. The identification of CPE now seems to be more and more frequent, with a notable increase in the number of cases, especially those involving *K. pneumoniae*, during the last two years [12]. Moreover, we could note a change in the epidemiology with the increase of CPE from patients without

a history of travelling in foreign countries. In the Mediterranean area, only a few studies have investigated the prevalence of digestive carriage and were mainly conducted during outbreak periods [3, 6]. To our knowledge, our study is the first that investigates the rate of CR GNB and CPE faecal carriage in three French regions (Midi-Pyrénées, Languedoc-Roussillon, Provence-Alpes-Côte d'Azur) bordering the Mediterranean Sea.

At the time of this survey, the occurrence of CPE was very uncommon in the population hospitalised or consulting in the south of France (0.3 %), lower than that reported in Spain (1.1 %), Morocco (11 %) and Pakistan (18.3 %) [3, 5, 6]. The unique strain recovered in our study was the most widespread CPE in France and in our region: the OXA-48-producing

Table 1 Characteristics of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli strains isolated from faecal carriage in southern France

Strain no.	Species	Sample	Hospitalisation unit/hospital	Carbapenem MICs (µg/ml)				Co-resistances	Carbapenemases	MLST
				IMP	ETP	MEM	DOR			
NIM302	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Stool	ICU/Nîmes	0.5	2	0.38	0.25	CIP, OFX, NA, C, SXT, K, TM, GM	OXA-48	ST15
NIM49	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Rectal swab	Geriatric/Nîmes	>32	>32	>32	>32	CIP, OFX, NA, C, SXT, K, TM, GM, AMK, NET	OXA-23, OXA-51	ST2
NIM204	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Stool	Rehabilitation unit/Nîmes	>32	>32	>32	>32	CIP, OFX, NA, C, SXT, K, TM, GM, AMK, NET	OXA-23, OXA-51	ST2

ICU intensive care unit; IMP imipenem; ETP ertapenem; MEM meropenem; DOR doripenem; K kanamycin; GM gentamicin; NET netilmicin; TM tobramycin; AMK amikacin; NA nalidixic acid; OFX ofloxacin; CIP ciprofloxacin; C chloramphenicol; SXT cotrimoxazole; MLST multilocus sequence typing

K. pneumoniae [12, 13]. As with half of the patients colonised/infected by OXA-48-producers in France [11], the carrier had been hospitalised in Morocco in the year preceding the isolation of the strain (Casablanca University Hospital). This enzyme is widespread in this country since its first identification in 2010 [14], and has generated several outbreaks in many European countries [12, 15]. The strain belonged to ST15, an international clone predominantly associated with the spread of different ESBLs in China, central Europe and recently described as carrying the *bla*_{OXA-48} gene in Finland [15–19]. The strains detected by PCR were considered to belong to *K. pneumoniae* due to the prevalence of this bacteria in our region [13]. However, we could not exclude the carriage of a non-pathogenic commensal carrying the *bla*_{OXA-48} gene (e.g. *Shewanella* spp.). Concerning *A. baumannii*, the occurrence of OXA-23-producers is very low (<0.1 %). As previously described in European countries, the OXA-58- and OXA-24-producers have been replaced by OXA-23-producers [20]. In the Languedoc-Roussillon region, almost all OXA-23-producing *A. baumannii* strains belonged to the widespread ST2/international clone II [13], and were mainly associated with hospitalisations in long-stay units, as observed in our population. Finally, no patient carried carbapenemase-producing *P. aeruginosa*, bacteria very uncommon in our region.

Our study validated that the chromID® OXA-48 medium is both sensitive and highly specific for CPE detection. Moreover, the combined use of chromID® OXA-48 and chromID® CARBA should allow accurate detection of all clinically relevant carbapenemases. These results are in accordance with previous data [8, 21, 22]. Girlich et al. showed that the chromID® OXA-48 medium has the highest specificity, 100 %, as compared to 53 and 68 % for the SUPERCARBA and chromID® CARBA media, respectively for detecting those OXA-48-producers [8]. The sensitivity of chromID® CARBA was evaluated to be 96.5 and 96.9 % in two clinical studies, respectively [21, 22]. The specificity was 91.2 % at the reading level and 100.0 % after Gram staining [21]. Vroni et al. found a greater specificity (96.9 %) [22]. All these results suggest that we used a rapid and accurate culture screening method for our study and allow to validate our low carriage prevalence. Moreover, the NucliSENS EasyQ® KPC PCR assay had also demonstrated a high sensitivity and specificity (93.3 and 99.0 %, respectively) [23].

Conclusion

The low prevalence of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) in this study represents a useful baseline. Despite this low level of carriage prevalence, the emergence of OXA-48-producers in other situations, including epidemic cases, is described in the south of France. This underlines the

importance to maintain vigilance and control strategies including strict hand hygiene and screening of patients who may be at risk of CPE carriage (notably patients previously hospitalised in foreign countries) to prevent/limit the spread of these multidrug-resistant microorganisms.

Acknowledgements This work was supported by University Montpellier 1 and the French National Institute of Health and Medical Research (INSERM).

We thank bioMérieux for providing us the different screening media and the NucliSENS EasyQ® KPC kits.

Conflict of interest The authors report no conflicting interests.

References

1. Nordmann P, Naas T, Poirel L (2011) Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 17:1791–1798
2. Patel G, Bonomo RA (2013) “Stormy waters ahead”: global emergence of carbapenemases. *Front Microbiol* 4:48
3. Girlich D, Bouihat N, Poirel L, Benouda A, Nordmann P (2014) High rate of faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase and OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae at a University hospital in Morocco. *Clin Microbiol Infect* 20:350–354
4. Boutet-Dubois A, Pantel A, Prère MF, Bellon O, Brieu-Roche N, Lecaillon E, Le Coustumier A, Davin-Regli A, Villeneuve L, Bouzige N, Gleize E, Lamarca R, Dunyach-Remy C, Sotto A, Lavigne JP (2013) Faecal carriage of oxyiminocephalosporin-resistant Enterobacteriaceae among paediatric units in different hospitals in the south of France. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 32: 1063–1068
5. Day KM, Ali S, Mirza IA, Sidjabat HE, Silvey A, Lanyon CV, Cummings SP, Abbasi SA, Raza MW, Paterson DL, Perry JD (2013) Prevalence and molecular characterization of Enterobacteriaceae producing NDM-1 carbapenemase at a military hospital in Pakistan and evaluation of two chromogenic media. *Diagn Microbiol Infect Dis* 75:187–191
6. Gijón D, Curiao T, Baquero F, Coque TM, Cantón R (2012) Faecal carriage of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a hidden reservoir in hospitalized and nonhospitalized patients. *J Clin Microbiol* 50:1558–1563
7. Dévigne L, Pantel A, Bourguignon MP, Cellier M, Courbière E, Ghirardi S, Vignon V, Zambardi G, Lavigne JP (2013) First evaluation of chromID® OXA-48, a new chromogenic medium for detection of Enterobacteriaceae producing OXA-48 carbapenemase. In: Proceedings of the 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Berlin, Germany, April 2013. Available online at: <https://molecularhub.org/resources/207/download/eP683-1.pdf>. Accessed 10 October 2014
8. Girlich D, Anglade C, Zambardi G, Nordmann P (2013) Comparative evaluation of a novel chromogenic medium (chromID OXA-48) for detection of OXA-48 producing Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis* 77:296–300
9. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P (2011) Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 70:119–123
10. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, Amyes SG, Livermore DM (2006) Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents* 27:351–353

11. Vaux S, Carbonne A, Thiolet JM, Jarlier V, Coignard B; RAISIN and Expert Laboratories Groups (2011) Emergence of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in France, 2004 to 2011. *Euro Surveill* 16. pii: 19880
12. Robert J, Pantel A, Mérens A, Lavigne JP, Nicolas-Chanoine MH; ONERBA's Carbapenem Resistance Study Group (2014) Incidence rates of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae clinical isolates in France: a prospective nationwide study in 2011–12. *J Antimicrob Chemother* 69:2706–2712
13. Pantel A, Boutet-Dubois A, Jean-Pierre H, Marchandin H, Sotto A, Lavigne JP; CARB-LR group (2014) French regional surveillance program of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli: results from a 2-year period. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 33:2285–2292. doi:10.1007/s10096-014-2189-5
14. Hays C, Benouda A, Poirel L, Elouennass M, Nordmann P (2012) Nosocomial occurrence of OXA-48-producing enterobacterial isolates in a Moroccan hospital. *Int J Antimicrob Agents* 39:545–547
15. Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, Livermore DM, Miriagou V, Naas T, Rossolini GM, Samuelsen Ø, Seifert H, Woodford N, Nordmann P; European Network on Carbapenemases (2012) Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect* 18:413–431
16. Damjanova I, Tóth A, Pászti J, Hajbel-Vékony G, Jakab M, Berta J, Milch H, Füzi M (2008) Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Hungary in 2005—the new ‘MRSAs’? *J Antimicrob Chemother* 62: 978–985
17. Wang Q, Li B, Tsang AK, Yi Y, Woo PC, Liu CH (2013) Genotypic analysis of *Klebsiella pneumoniae* isolates in a Beijing hospital reveals high genetic diversity and clonal population structure of drug-resistant isolates. *PLoS One* 8:e57091
18. Sánchez-Romero I, Asensio A, Oteo J, Muñoz-Algarra M, Isidoro B, Vindel A, Alvarez-Avello J, Balandín-Moreno B, Cuevas O, Fernández-Romero S, Azañedo L, Sáez D, Campos J (2012) Nosocomial outbreak of VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates of multilocus sequence type 15: molecular basis, clinical risk factors, and outcome. *Antimicrob Agents Chemother* 56:420–427
19. Österblad M, Kirveskari J, Hakanen AJ, Tissari P, Vaara M, Jalava J (2012) Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Finland: the first years (2008–11). *J Antimicrob Chemother* 67:2860–2864
20. Minandri F, D'Arezzo S, Antunes LC, Pourcel C, Principe L, Petrosillo N, Visca P (2012) Evidence of diversity among epidemiologically related carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* strains belonging to international clonal lineage II. *J Clin Microbiol* 50:590–597
21. Papadimitriou-Olivgeris M, Bartzavali C, Christofidou M, Bereksi N, Hey J, Zambardi G, Spiliopoulou I (2014) Performance of chromID® CARBA medium for carbapenemases-producing Enterobacteriaceae detection during rectal screening. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 33: 35–40
22. Vrioni G, Daniil I, Voulgari E, Ranellou K, Koumaki V, Ghirardi S, Kimouli M, Zambardi G, Tsakris A (2012) Comparative evaluation of a prototype chromogenic medium (ChromID CARBA) for detecting carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in surveillance rectal swabs. *J Clin Microbiol* 50:1841–1846
23. McEwan AS, Derome A, Meunier D, Burns PJ, Woodford N, Dodgson AR (2013) Evaluation of the NucliSENS EasyQ KPC assay for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 51:1948–1950

Publication n°4

Robert J, Pantel A, Mérens A, Lavigne JP, Nicolas-Chanoine MH; ONERBA's Carbapenem Resistance Study Group. Incidence rates of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* clinical isolates in France: a prospective nationwide study in 2011-12. J Antimicrob Chemother. 2014 Oct;69(10):2706-12.

Incidence rates of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae clinical isolates in France: a prospective nationwide study in 2011–12

Jérôme Robert^{1–3*}, Alix Pantel^{4,5}, Audrey Mérens⁶, Jean-Philippe Lavigne^{4,5}
and Marie-Hélène Nicolas-Chanoine^{7–9} on behalf of ONERBA's Carbapenem Resistance Study Group†

¹Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, U1135, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI), Eq 13, F-75013 Paris, France; ²INSERM, U1135, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI), Eq 13, F-75013 Paris, France; ³Bactériologie-Hygiène, Hôpitaux Universitaires Pitié Salpêtrière—Charles Foix, APHP, F-75013 Paris, France; ⁴INSERM U1047, UFR de Médecine, Université Montpellier 1, Nîmes, France; ⁵Service de Microbiologie, CHU Carêmeau, Nîmes, France; ⁶Laboratoire de Biologie, Hôpital d'Instruction des Armées Bégin, Saint-Mandé, France; ⁷Service de Microbiologie, Hôpital Beaujon AP-HP, Clichy, France; ⁸Faculté de Médecine D. Diderot—Paris 7, Paris, France; ⁹INSERM UMR 1149, Université Paris 7, Paris, France

*Corresponding author. Laboratoire de Bactériologie-Hygiène, Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie (UPMC Paris 6), 91 Boulevard de l'Hôpital, 75634 Paris cedex 13, France. Tel: +33-1-40-77-97-49; Fax: +33-1-45-82-75-77; E-mail: jerome.robert@psl.aphp.fr

†Members are listed in the Acknowledgements.

Received 7 March 2014; returned 9 April 2014; revised 8 May 2014; accepted 19 May 2014

Objectives: To determine proportions and incidence rates of Enterobacteriaceae producing carbapenemase among those non-susceptible (NS) to carbapenems in France.

Methods: From November 2011 to April 2012, 71 laboratories recorded non-duplicate Enterobacteriaceae clinical isolates NS to at least one carbapenem and the total number of isolates of the different species. Carbapenem MICs were determined by broth microdilution and the β -lactamase content by DNA microarray.

Results: During the study period, the 71 laboratories identified 133 244 Enterobacteriaceae isolates, of which 846 (0.63%) were NS to at least one carbapenem. Carbapenem-NS isolates accounted for 0.07% (61/90 148) among *Escherichia coli* isolates, 1.1% (111/10 436) among *Klebsiella pneumoniae*, 8.2% (492/5971) among *Enterobacter cloacae* and 4.0% (84/2104) among *Enterobacter aerogenes*. Among the 541 available carbapenem-NS isolates, 222 (including 63 randomly selected *E. cloacae*) were further analysed after confirmation of carbapenem non-susceptibility. None of the *Enterobacter* spp. isolates produced carbapenemase. Among the other species, 28 isolates produced carbapenemases (22 OXA-48, 4 KPC and 2 NDM), accounting for an estimated proportion of carbapenemase-producing isolates of 0.08% for all species, 0.01% for *E. coli* and 0.27% for *K. pneumoniae*. The incidence-density rate in the participating hospitals was 0.0041 per 1000 hospital-days and the incidence rate was 0.0027 per 100 admissions.

Conclusions: The incidence-density rate of carbapenemase-producing isolates per 1000 hospital-days was low and 30-fold lower than that of carbapenem-NS isolates (0.125) and almost 300-fold lower than that of ESBL-producing isolates (1.104) in these French hospitals.

Keywords: carbapenem resistance, carbapenemase, epidemiology

Introduction

Bacteria resistant to most antibiotic classes are emerging throughout the world. Among them, carbapenemase-producing Enterobacteriaceae represent a real threat for public health. Indeed, Enterobacteriaceae are highly prevalent in community-acquired and nosocomial infections and carbapenems are often the last resort for the treatment of infections due to extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing isolates, which are increasing worldwide.^{1,2} Hence, the emergence and spread of

carbapenemase-producing Enterobacteriaceae may lead to a therapeutically dead end for life-threatening infections.

Through a literature review, it is now possible to map the countries where carbapenemase-producing Enterobacteriaceae have been isolated.³ However, it is more difficult to evaluate the magnitude of this emerging resistance because most of the reports provide data on aggregate cases or outbreaks of carbapenemase-producing isolates^{4–8} and seldom incidence or prevalence rates. To make it difficult, carbapenemase production is not the single mechanism involved in carbapenem resistance in Enterobacteriaceae.

Indeed, reduced outer membrane permeability in combination with overproduction of Amp-C β -lactamase⁹ or production of ESBL¹⁰ are known to be responsible for carbapenem resistance in Enterobacteriaceae. In addition, it is not simple to differentiate between carbapenemase production and other mechanisms of carbapenem resistance in the routine laboratory. In numerous cases, molecular biology, which is not routinely available, is the single means to identify or exclude carbapenemase production in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae.

Therefore, we sought to clarify the incidence and epidemiology of carbapenem non-susceptible (NS) Enterobacteriaceae isolates in France, especially of those producing carbapenemase, through a nationwide study.

Materials and methods

Participants

A total of 71 laboratories affiliated to the Observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques (ONERBA, www.onerba.org) networks participated on a voluntary basis in the study, including 69 laboratories located across metropolitan France and 2 on La Réunion Island. Twenty-one served university hospitals, 2 military hospitals and 34 general hospitals. The participating hospitals accounted for a total of 13 580 000 hospital-days per year, i.e. 11% of all French hospital-days. The 14 remaining laboratories were private practice laboratories that served ambulatory care or private hospitals.

Bacteria and collected data

From November 2011 to April 2012, the 71 laboratories collected all non-duplicate NS Enterobacteriaceae clinical isolates, i.e. intermediate susceptible or resistant to at least one carbapenem according to the 2011 recommendations of the French Antibiogram Committee.¹¹ Ertapenem and at least one other carbapenem had to be tested routinely for all isolates. Isolates were NS to ertapenem when the ertapenem MIC was >0.5 mg/L (Etest system, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Non-susceptibility (i.e. intermediate susceptibility or resistance) to the other carbapenems was assessed on either the MIC value or the size of the inhibition zone diameter: imipenem: >2 mg/L, and <24 mm, respectively, meropenem: >2 mg/L and <22 mm, respectively and doripenem: >1 mg/L, and <24 mm, respectively. Non-susceptibility to carbapenems of the *Proteae* tribe isolates had to be assessed on the basis of MIC values (Etest system) of ertapenem and meropenem or doripenem, but not of imipenem because of the natural reduced susceptibility of this bacterial group to imipenem. Identification to the species level was performed by using routine identification methods used in each laboratory, i.e. mainly by the API 20E or Vitek 2 systems (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

For each carbapenem-NS Enterobacteriaceae isolate, the following data also were provided: susceptibility to extended-spectrum cephalosporins according to the 2011 recommendations of the French Antibiogram Committee,¹¹ production of ESBL according to the double-disc synergy test¹² or the expert system of automated methods, sample type, ward specialty if any, previous history of hospitalization in France or abroad and recent travel history.

Characterization of the carbapenem-NS Enterobacteriaceae isolates

Participating laboratories were asked to send all isolates NS to at least one of the four carbapenems to a referral centre for further analysis. Ertapenem, imipenem, meropenem and doripenem MICs were determined by using the broth microdilution method in 96 well-plates

containing lyophilized antibiotics (Sensititre MIC plates, Biocentric, Bandal, France). The *bla* genes encoding carbapenemases (KPC, NDM, IMP, VIM and OXA-48 group) were detected by DNA microarray (Check-MDR CT103 array, Check-Points, Wageningen, The Netherlands) for all isolates NS to at least one carbapenem.

Statistical analysis

We estimated the number of carbapenemase-positive isolates among carbapenem-NS isolates by cross multiplication using the proportion of carbapenemase-positive isolates among tested isolates. This estimated number was used to derive estimated proportions of carbapenemase-positive isolates among each species. In addition, admission and hospital-days data were recorded for each hospital in order to estimate incidence and incidence-density rates. Fisher's exact test was used to compare proportions. A *P* value <0.05 was considered as statistically significant.

Results

Enterobacteriaceae clinical isolates

The 71 laboratories identified 133 244 non-duplicate Enterobacteriaceae clinical isolates between November 2011 and April 2012 (Table 1). Among them, 11 471 (8.6%) were NS to extended-spectrum cephalosporins, 7492 (5.6%) produced ESBL and 846 (0.6%) were NS to at least one carbapenem in the participating laboratories (Table 1).

Enterobacteriaceae NS to carbapenems

Among the 846 carbapenem-NS isolates, *Enterobacter cloacae* was the dominant species (58.2%). The proportion of carbapenem-NS isolates among all *E. cloacae* isolated during the study period was 8.2% (Table 1). This proportion was 4.0% for *Enterobacter aerogenes* and 3.6% for *Citrobacter freundii*, whereas it was lower for *Klebsiella pneumoniae* (1.1%) and particularly for *Escherichia coli* (0.07%) (Table 1).

The proportion of carbapenem-NS isolates was 0.95% in university hospitals (including the two military hospitals), 0.48% in general hospitals and 0.21% in private practice laboratories. This trend towards a higher proportion of carbapenem-NS isolates in university hospitals was observed for most of the species (Table 2).

Of the 846 carbapenem-NS isolates, 541 (including 335 *E. cloacae* and 206 non-*E. cloacae* isolates) were sent to the central laboratory. Other isolates were missing mainly due to lack of proper isolate conservation in the participating laboratories. As the prevalence of carbapenemase in *E. cloacae* isolates was deemed to be extremely low at the time of the study in France (www.invs.sante.fr), only one-fifth ($n=68$) were randomly selected by using a random number list for further analysis (Figure 1). No additional tests were performed on non-selected *E. cloacae* isolates. After checking species identification and determination of carbapenem MICs for the 274 retained isolates, 52 were excluded (including 5 *E. cloacae*) because of either absence of growth ($n=4$), species misidentification ($n=4$), carbapenem susceptibility ($n=26$) or lack of data for denominator computation ($n=18$). Among the 222 isolates finally included in the molecular study (Figure 1), 95 (42.8%) were isolated from urines, 37 (16.7%) from the respiratory tract, 30 (13.5%) from blood cultures and 22 (9.9%) from surgical wounds. The place of care was unknown for 18 (8.1%) of the 222 patients. A total of 61 (27.5%)

Table 1. Distribution of clinical isolates according to species

Species	Total isolates	NS to ESC [n (%)]	ESBL+ [n (%)]	NS to CARB [n (%)]	CARBase+/no. tested (%)	Estimated proportion of isolates CARBase+ (%)
<i>E. coli</i>	90148	5660 (6.3)	4632 (5.1)	61 (0.07)	4/28 (14.3)	0.01
<i>K. pneumoniae</i>	10436	1561 (15.0)	1564 (15.0)	111 (1.1)	17/68 (25.0)	0.27
<i>P. mirabilis</i>	8641	111 (1.3)	70 (0.8)	1 (0.01)	1/1 (100)	0.01
<i>E. cloacae</i> ^a	5971	1842 (30.8)	713 (11.9)	492 (8.2)	0/63 (0)	—
<i>K. oxytoca</i>	3482	281 (8.1)	92 (2.6)	6 (0.2)	2/4 (50.0)	0.09
<i>C. koseri</i>	2509	77 (3.1)	70 (2.8)	1 (0.04)	0	—
<i>M. morganii</i>	2573	428 (16.6)	31 (1.2)	0 (0)	0	—
<i>E. aerogenes</i>	2104	650 (30.9)	164 (7.8)	84 (4.0)	0	—
<i>Serratia</i> spp.	1888	193 (10.2)	24 (1.3)	16 (0.9)	1/8 (12.5)	0.11
<i>C. freundii</i>	1451	445 (30.6)	84 (5.8)	52 (3.6)	1/10 (10.0)	0.36
<i>P. vulgaris</i>	1050	28 (2.7)	7 (0.7)	1 (0.1)	0/1 (0)	—
<i>Salmonella</i> spp.	590	6 (1.0)	6 (1.0)	1 (0.2)	1/1 (100)	0.17
<i>Providencia</i> spp.	523	17 (3.3)	8 (1.5)	0 (0)	0	—
<i>Shigella</i> spp.	60	1 (1.7)	1 (1.7)	0 (0)	0	—
Others	1821	173 (9.5)	26 (1.4)	20 (1.1)	1/10 (10.0)	0.11
Total	133244	11471 (8.6)	7492 (5.6)	846 (0.6)	28 (12.6)	0.08

NS to ESC, non-susceptible to extended-spectrum cephalosporins; ESBL+, ESBL positive; NS to CARB, non-susceptible to carbapenems; CARBase, carbapenemase.

^aIsolates tested for carbapenemase production were randomly selected.

Table 2. Number (N) and proportion (%) of carbapenem non-susceptible Enterobacteriaceae, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* clinical isolates according to the type of medical activity

Species (N)	University hospital		General hospital		Private practice laboratory		Total	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)
<i>E. coli</i> (90148)	36	(0.10)	22	(0.06)	3	(0.02)	61	(0.07)
<i>K. pneumoniae</i> (10436)	78	(1.47)	27	(0.68)	6	(0.49)	111	(1.06)
<i>E. cloacae</i> (5971)	298	(12.46)	160	(11.10)	34	(1.59)	492	(8.24)
Enterobacteriaceae (133244)	540	(0.95)	255	(0.48)	51	(0.21)	846	(0.64)

of the isolates were from intensive care units (ICUs), 52 (23.4%) from medical wards, 38 (17.1%) from surgical wards, 25 (11.3%) from rehabilitation or long-term care units, 16 (7.2%) from emergency departments and 12 (5.4%) from outpatient clinics or ambulatory care.

Bacteriological and epidemiological data of the carbapenemase-producing isolates

Among the 222 isolates, 28 (12.6%) produced a carbapenemase, including 22 OXA-48 group, 4 KPC and 2 NDM. The OXA-48 group was mainly detected in *K. pneumoniae* ($n=13$) and *E. coli* ($n=4$). KPC was only detected in *K. pneumoniae*, whereas NDM was detected in one isolate of *Proteus mirabilis* and one isolate of *Salmonella* spp. None of the tested carbapenemases was detected in the 63 studied *E. cloacae* isolates. Among carbapenemase-positive isolates, MICs ranged from 1 to 64 mg/L for imipenem, from 0.25 to 64 mg/L for meropenem and from 0.12 to 32 mg/L for doripenem. Eleven (39.3%) carbapenemase-positive isolates

were susceptible to imipenem, 19 (67.9%) to meropenem, 12 (42.9%) to doripenem and 9 (32.1%) to all three carbapenems. For the three carbapenems, MIC ranges were similar for both carbapenemase-positive and carbapenemase-negative isolates. However, modal MICs were consistently lower for carbapenemase-negative isolates. A total of 154 (79.4%) carbapenemase-negative isolates were susceptible to imipenem, 161 (83.0%) to meropenem, 151 (77.8%) to doripenem and 139 (71.6%) to all three carbapenems.

A total of 18 (64.3%) of the carbapenemase-positive isolates were ESBL positive compared with 81 (41.8%) of the carbapenemase-negative isolates ($P=0.04$). Among species without chromosomal AmpC, plasmid-mediated AmpC was identified in 2 of the 25 (8.0%) carbapenemase-positive isolates compared with 20 of the 78 (25.6%) carbapenemase-negative isolates ($P=0.09$).

The clinical specimens with carbapenemase-positive isolates were mainly urines ($n=11$, 39.3%), surgical wounds ($n=7$, 25.0%) and blood cultures ($n=4$, 14.3%). For two patients, the place of care was not recorded. Among the 26 remaining patients,

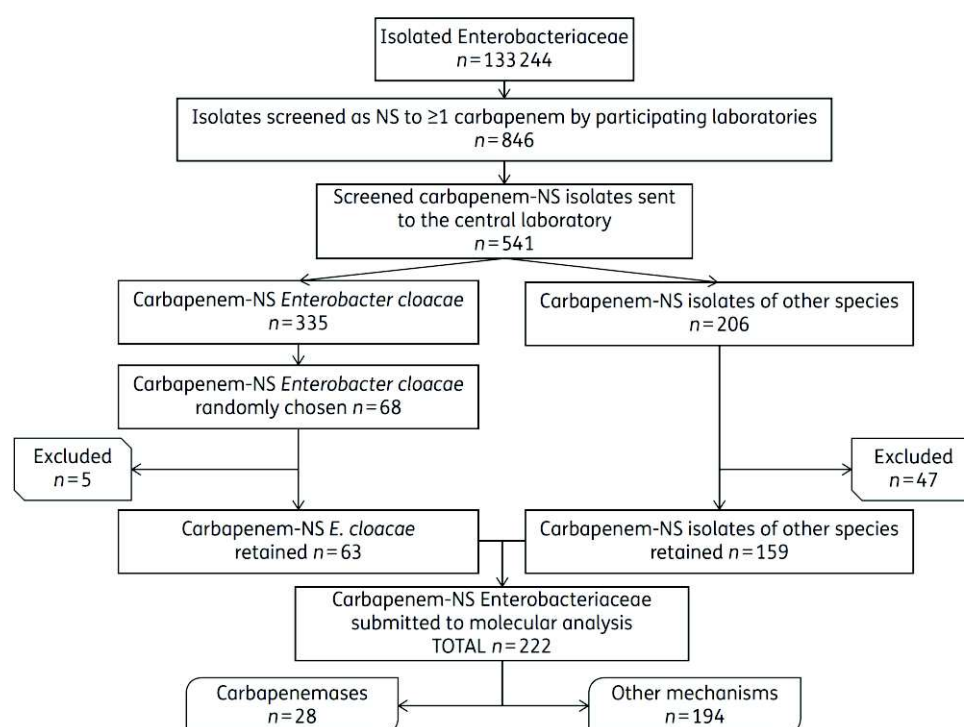


Figure 1. Flow chart of the selection process of isolates submitted to molecular analysis (NS, non-susceptible).

Table 3. Incidence and incidence-density rates of ESBL-producing isolates, carbapenem non-susceptible and carbapenemase-producing isolates according to the type of healthcare facility

Healthcare facility	ESBL-producing isolates		Carbapenem-NS isolates		Carbapenemase-producing isolates	
	/100 admissions	/1000 hospital-days	/100 admissions	/1000 hospital-days	/100 admissions	/1000 hospital-days
University hospital	0.764	1.165	0.103	0.156	0.0030	0.0046
General public hospital	0.519	0.760	0.055	0.081	0.0019	0.0028
All types	0.734	1.104	0.083	0.125	0.0027	0.0041

9 (34.6%) were in ICUs, 8 (30.8%) in surgical wards, 4 (15.4%) in medical wards, 2 (7.7%) in emergency departments, 2 (7.7%) in ambulatory care and 1 (3.8%) in rehabilitation or long-term care unit.

Patients harbouring carbapenemase-positive isolates were more likely than others to have been hospitalized abroad (40.7% versus 3.5%, $P < 0.01$) or to have travelled abroad in the last year (57.7% versus 6.3%, $P < 0.01$). In contrast, they were not more likely to have a recent history of hospitalization in France (56.0% versus 66.5%, $P = 0.27$).

Estimated proportion and incidence rates of carbapenemase-positive isolates

The estimated proportion of carbapenemase-producing isolates was 0.08% overall, 0.12% in university hospitals, 0.06% in general hospitals and 0.02% in private practice laboratories.

The incidence-density rate of carbapenemase-producing isolates in the participating hospitals during the 6 month study period was 0.0041 per 1000 hospital-days (Table 3). This incidence-density rate was 30-fold lower than that of all carbapenem-NS isolates and almost 300-fold lower than that of all ESBL-producing isolates (Table 3).

The incidence-density rate of carbapenemase-producing isolates was ~1.6-fold higher in university hospitals than in general hospitals (Table 3).

Discussion

The intercontinental dissemination of carbapenem-NS Enterobacteriaceae, notably those producing carbapenemase, is globally worrisome.^{13–16} However, the magnitude of this emerging resistance is currently poorly known because of the lack of appropriate studies. Indeed, most of the studies are case reports or provide

the carbapenemase-positive isolate proportion among selected isolates.^{8,17,18} Therefore, we sought to evaluate the proportion and incidence rates of carbapenemase-positive isolates among consecutive unselected and non-duplicate clinical isolates of Enterobacteriaceae collected throughout the French territory. We showed that the proportion of carbapenem-NS Enterobacteriaceae isolates was 0.6% among 133 244 clinical isolates and estimated that the overall proportion of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae was 0.08% between November 2011 and April 2012. The incidence-density rate of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae was very low (0.0041 per 1000 hospital-days).

Huang et al.,¹⁹ who used a similar methodology in Belgium, found a proportion of carbapenem-NS Enterobacteriaceae isolates of 3.5% (158/4568) and of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae of 0.28% in 2012. Of note, in Belgium, only patients from acute-care hospitals were included whereas patients from long-term care facilities and ambulatory care were also included in the present study. Nevertheless, we reported a proportion of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae of 0.12% and 0.06% in university and general hospitals, respectively, suggesting that the emergence of carbapenemase in Enterobacteriaceae is less prevalent in France than in Belgium.

Two large studies conducted in 2009–10 in Spain and Canada found proportions of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae of 0.04% and 0.02%, respectively.^{20,21} These proportions are closer to our findings than those from Belgium. However, the Spanish and Canadian studies overselected the isolates or overlooked the OXA-48 group carbapenemase, which is the dominant carbapenemase in Belgium (53%), France (>75%) and Mediterranean countries.^{19,22,23} Therefore, the real proportions of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Spain and Canada could be higher than those reported.

Both the Belgian study and the current study clearly showed that *Enterobacter* spp. isolates were predominant among the carbapenem-NS Enterobacteriaceae (57% and 61%, respectively) and none of them produced carbapenemase. Recently, the French Associated National Reference Centre for Antibiotic Resistance identified 33 (5.3%) *Enterobacter* spp. isolates producing carbapenemase among 627 *Enterobacter* spp. isolates belonging to a collection of 1485 carbapenem-NS Enterobacteriaceae received during 2012.²² However, the proportion found in the latter study is not significantly different from the one found in the present study ($P=0.08$), although it is suspected to be higher because the isolates sent to a reference centre for confirmatory analysis are likely to be highly selected and Dortet's study has a high proportion of rectal swabs isolates (59.8%),²² which were excluded from our study.

The rather low proportion of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae among all carbapenem-NS ones, which is ~10% in the Belgian study and the present study, emphasizes the need for a simple and efficient method of screening for such strains in order to quickly implement drastic infection control measures to prevent dissemination. The need for a test that can be used in the routine laboratory is reinforced by the fact we showed that carbapenemase-producing Enterobacteriaceae were isolated in private laboratories. Numerous methods have been proposed, but none is currently satisfactory.^{24–26}

To our knowledge, the present study is the first one to provide an estimate of incidence rate data regarding carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in the healthcare setting: 0.0041

per 1000 hospital-days and 0.0027 per 100 admissions. In the participating facilities, these figures are 30-fold lower than that of all carbapenem-NS isolates and almost 300-fold lower than that of all ESBL-producing isolates. Of note, the carbapenemase-positive incidence-density rate is almost 100-fold lower than that reported for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the annual nationwide survey performed annually in France.²⁷ Fortunately, the carbapenemase threat remains rare in French hospitals compared with the ESBL endemicity. This endemicity represents a high risk for carbapenem overuse and, subsequently, a high pressure for selecting carbapenemase-NS isolates. Therefore, it is of paramount importance not to give up the battle against ESBL-producing bacteria. It is even more important because a large proportion of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae also produce ESBL.

Our study reported that, among patients with carbapenem-NS isolates, those with a carbapenemase-producing isolate were more likely to have had recent international travel or hospitalization abroad. This confirms previous case reports^{4,28,29} and is consistent with the carbapenemase-positive isolate epidemiology in some countries.^{5,6} However, the great majority (13/15) of the patients identified with carbapenemase-producing isolates in Belgium did not have a history of travel to a foreign country. This suggests local dissemination of carbapenemase-producing isolates in Belgium and could consequently explain the higher proportions of these isolates in this country.

Our study has two weaknesses. First, the incidence rates provided in this study are estimated because participant laboratories did not send all carbapenem-NS isolates eligible for further testing. Second, we did not test for the less-common carbapenemase enzymes (GES, SME, IMI and NMC) that have seldom been reported in France during the same period.^{22,30} Therefore, it is likely that very few carbapenemase-positive isolates producing the latter enzymes were missed and the incidence rates will have been very similar.

In conclusion, the proportion and incidence rates of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in France remain rather low, although the number of cases is increasing.³⁰ The rising threat calls for aggressive management of patients harbouring suspected or confirmed carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in order to prevent cross-transmission, at least in healthcare settings. Government legislation has been issued in France regarding highly resistant bacteria to enforce the implementation of hygiene precautions. Moreover, local and international guidelines addressing this issue have been published.^{31,32} However, the 'carbapenemase phenomenon' does not bear comparison with the constant rise of ESBL-producing Enterobacteriaceae in most countries.

Acknowledgements

We are grateful to Prof Vincent Jarlier for his thoughtful comments.

ONERBA's Carbapenem Resistance Study Group

Listing is by city (microbiologist).

Aix-en-Provence (N. Brieu), Angers (A. Vrain), Argenteuil (A. Scanvic), Aulnay-sous-Bois (H. Porcheret), Belfort (P. Garnier), Besançon (X. Bertrand), Béthune (D. Descamps), Blois (C. Hombrouck), Bordeaux-MIA

(B. Soullié), Boulogne-Billancourt (B. Heym), Bourg-en-Bresse (H. de Montclos), Bry-sur-Marne (H. Garrec), Chambéry (M. Levast), Charleville-Mézières (L. Mendes-Martins), Clamart (J. W. Decousser), Cherbourg (C. Huet), Clichy (F. Bert), Colmar (V. Herzig), Commercy (J. P. Klein), Créteil (B. Nebbad), Douai (S. Hendricx), Dunkerque (A. Verhaeghe), Eprenay (C. Lafaurie), Freyming-Merlebach (C. Lanselle), Garches (F. Elsayed), Gonesse (A. Carrer), Ivry (L. Drieux-Rouzet), Le-Havre (F. Evreux), Le-Mans (C. Varache), Lille (F. Wallet), Limoges (C. Martin), Lorient (J. M. Le-Bris), Metz (M. C. Moulhade), Mont-Saint-Martin (E. Deville), Montceau-les-Mines (O. Menouni), Montpellier (H. Jean-Pierre), Mulhouse-Diaconat (P. Pierrot), Mulhouse-CH E. Muller (J. M. Delarbre), Nantes (B. Coude), Neufchâteau (M. Foca), Nice-Archet (N. Degand), Nice-Labazur (L. Prots), Nîmes (A. Pantel), Orsay (M. N. Adam), Perpignan (E. Laurens), Paris-Lariboisière (L. Raskine), Paris-Pitié (S. Laouira), Paris-Tenon (G. Arlet), Périgueux (R. Sanchez), Pessac (O. Peuchant), Poitiers (V. Grau), Reichshoffen (C. Laurent), Reims (C. De-Champs), Roubaix (A. Vachée), Saint-Amand-Montrond (P. Harriau), Saint-Mandé (A. Mérens), Saint-Denis Réunion (O. Belmonte), Saint-Dié-des-Vosges (G. Michel), Saint-Nicolas-de-Port (C. Henry), Saint-Pierre Réunion (S. Picot), Saverne (I. Glatz), Strasbourg (T. Gueudet), Suresnes (P. Honderlick), Toulouse-CHU (L. Cavalié), Toulouse-Pasteur (J. L. Galinier), Tourcoing (P. Patoz), Tours-CHU (N. van-der-Mee-Marquet), Tours-LABM-Arnaud (E. Haguenoer), Valenciennes (F. Canis), Villejuif (N. Kassiss-Chikhany) and Vitry (Y. Le-Garrec).

Funding

This work was supported by the French Society for Microbiology (SFM, www.sfm-microbiologie.org).

Transparency declarations

All authors declare no conflict of interest.

References

- Pitout JDD, Laupland KB. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* 2008; **8**: 159–66.
- Zilberberg MD, Shorr AF. Secular trends in gram-negative resistance among urinary tract infection hospitalizations in the United States, 2000–2009. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2013; **34**: 940–6.
- Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis* 2013; **13**: 785–96.
- Carbonne A, Thiolet JM, Fournier S et al. Control of a multi-hospital outbreak of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* type 2 in France, September to October 2009. *Euro Surveill* 2010; **15**: pii=19734.
- Marchaim D, Navon-Venezia S, Schwaber MJ et al. Isolation of imipenem-resistant *Enterobacter* species: emergence of KPC-2 carbapenemase, molecular characterization, epidemiology, and outcomes. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 1413–8.
- Giakoupi P, Maltezou H, Polemis M et al. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Greek hospitals are mainly due to a hyperendemic clone. *Euro Surveill* 2009; **14**: pii=19218.
- Cuzon G, Bonnín RA, Nordmann P. First identification of novel NDM carbapenemase, NDM-7, in *Escherichia coli* in France. *PLoS One* 2013; **8**: e61322.
- Potron A, Kalpoe J, Poirel L et al. European dissemination of a single OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* clone. *Clin Microbiol Infect* 2011; **17**: E24–6.
- Lee EH, Nicolas MH, Kitzis MD et al. Association of two resistance mechanisms in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae* with high-level resistance to imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; **35**: 1093–8.
- Bornet C, Davin-Regli A, Bosi C et al. Imipenem resistance of *Enterobacter aerogenes* mediated by outer membrane permeability. *J Clin Microbiol* 2000; **38**: 1048–52.
- Société Française de Microbiologie. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie: Recommandations 2011. http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/casfm_2011.pdf (5 May 2014, date last accessed).
- Garrec H, Drieux-Rouzet L, Golmard J-L et al. Comparison of nine phenotypic methods for detection of extended-spectrum β -lactamase production by Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2011; **49**: 1048–57.
- Cantón R, Akóva M, Carmeli Y et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2012; **18**: 413–31.
- Logan LK. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: an emerging problem in children. *Clin Infect Dis* 2012; **55**: 852–9.
- Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! *Trends Mol Med* 2012; **18**: 263–72.
- Gupta N, Limbago BM, Patel JB et al. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: epidemiology and prevention. *Clin Infect Dis* 2011; **53**: 60–7.
- Castanheira M, Farrell SE, Deshpande LM et al. Prevalence of β -lactamase-encoding genes among Enterobacteriaceae bacteremia isolates collected in 26 US hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2010). *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 3012–20.
- Ellis C, Chung C, Tijet N et al. OXA-48-like carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Ottawa, Canada. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; **76**: 399–400.
- Huang T-D, Berhin C, Bogaerts P et al. Prevalence and mechanisms of resistance to carbapenems in Enterobacteriaceae isolates from 24 hospitals in Belgium. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**: 1832–7.
- Miró E, Agüero J, Larrosa MN et al. Prevalence and molecular epidemiology of acquired AmpC β -lactamases and carbapenemases in Enterobacteriaceae isolates from 35 hospitals in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013; **32**: 253–9.
- Mataseje LF, Bryce E, Roscoe D et al. Carbapenem-resistant Gram-negative bacilli in Canada 2009–10: results from the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program (CNISP). *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**: 1359–67.
- Dortet L, Cuzon G, Nordmann P. Dissemination of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in France, 2012. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**: 623–7.
- Potron A, Poirel L, Rondinaud E et al. Intercontinental spread of OXA-48 β -lactamase-producing Enterobacteriaceae over a 11-year period, 2001 to 2011. *Euro Surveill* 2013; **18**: pii=20549.
- Dortet L, Brécard L, Cuzon G et al. Strategy for a rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2014. doi:10.1128/AAC.01239-13.
- Levy Hara G, Gould I, Endimiani A et al. Detection, treatment, and prevention of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: recommendations from an international working group. *J Chemother* 2013; **25**: 129–40.
- Doyle D, Peirano G, Lascols C et al. Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases. *J Clin Microbiol* 2012; **50**: 3877–80.

- 27** Arnaud I, Blanchard H, Jarlier V. *Surveillance des bactéries multirésistantes dans les établissements de santé en France. Réseau BMR-Raisin—Résultats 2011*. http://opac.invs.sante.fr/doc_num.php?explnum_id=8853 (5 May 2014, date last accessed).
- 28** Fournier S, Lepointeur M, Kassis-Chikhani N et al. Link between carbapenemase-producing enterobacteria carriage and cross-border exchanges: eight-year surveillance in a large French multihospitals institution. *J Travel Med* 2012; **19**: 320–3.
- 29** Babouee B, Widmer AF, Dubuis O et al. Emergence of four cases of KPC-2 and KPC-3-carrying *Klebsiella pneumoniae* introduced to Switzerland, 2009–10. *Euro Surveill* 2011; **16**: pii=19817.
- 30** Vaux S, Carbonne A, Thiolet JM et al. Emergence of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in France, 2004 to 2011. *Euro Surveill* 2011; **16**: pii=19880.
- 31** Tacconelli E, Cataldo MA, Dancer SJ et al. ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients. *Clin Microbiol Infect* 2014; **20** Suppl 1: 1–55.
- 32** Haut Conseil de la Santé Publique. Recommandations pour la prévention de la transmission croisée des 'Bactéries Hautements Résistantes aux antibiotiques émergentes' (BHRe). http://www.hcsp.fr/Explore.cgi/Telecharger?NomFichier=hcspr20130710_recoprevtransxbhre.pdf (5 May 2014, date last accessed).

Publication n°5

Liapis E, Pantel A, Robert J, Nicolas-Chanoine MH, Cavalié L, van der Mee-Marquet N, de Champs C, Aissa N, Eloy C, Blanc V, Guyeux C, Hocquet D, Lavigne JP, Bertrand X; ONERBA. Molecular epidemiology of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in France.

Clin Microbiol Infect. 2014 Dec;20(12):O1121-3.

Molecular epidemiology of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in France

E. Liapis¹, A. Pantel^{2,3}, J. Robert^{4,5,6}, M.-H. Nicolas-Chanoine^{7,8,9}, L. Cavalie¹⁰, N. van der Mee-Marquet¹¹, C. de Champs¹², N. Aissa¹³, C. Eloy¹⁴, V. Blanc¹⁵, C. Guyeux¹⁶, D. Hocquet¹, J.-P. Lavigne^{2,3}, X. Bertrand¹, On behalf of ONERBA

1) Service d'Hygiène Hospitalière, UMR 6249 Chrono-environnement, Centre Hospitalier Régional Universitaire, Université de Franche-Comté, Besançon, 2) Laboratoire de Bactériologie, CHU Carémieu, Nîmes Cedex 09, 3) Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1047, Université Montpellier 1, UFR Médecine, Nîmes, 4) AP-HP, Hôpitaux Universitaires Pitié Salpêtrière – Charles Foix, Bacteriology and Hygiene, Paris, France, 5) Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, CR7, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses CIMI, Team E13 (Bacteriology), 6) INSERM, U1135, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses, CIMI, Team E13 (Bacteriology), 7) Service de Microbiologie, Hôpital Beaujon AP-HP, Clichy, France, 8) Faculté de Médecine D. Diderot, 9) Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U773, Centre de Recherche Biomédicale Bichat-Beaujon (CRB3), Université Paris 7, Paris, 10) Service de Bactériologie, CHU Toulouse, Toulouse, 11) Service de Bactériologie-Hygiène, CHU Tours, Tours, 12) Service de Bactériologie, CHU Reims, Reims, 13) Service de Bactériologie, CHU Nancy, Nancy, 14) Service de Bactériologie, CH Troyes, Troyes, 15) Service de Bactériologie, CH Antibes, Antibes and 16) Département DISC, Institut FEMTO-ST, UMR 6174 CNRS, Université de Franche-Comté, Belfort Cedex, France

Article published online: 19 June 2014

Clin Microbiol Infect 2014; 20: O1121–O1123
10.1111/1469-0691.12727

Corresponding author: X. Bertrand, Service d'Hygiène Hospitalière, Centre Hospitalier Universitaire, 3 Boulevard Fleming, Besançon, Cedex 25030, France
E-mail: xbertrand@chu-besancon.fr

The emergence of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) has become a major public health concern [1,2]. In France, OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* (OXA-48-Kp) represented two-thirds of the 627 cases of CPE reported between January 2004 and September 2013 to the mandatory national surveillance system [3]. Here, we assess the genetic population structure of a significant sample of the OXA-48-Kp recovered in French hospitals.

We selected 53 OXA-48-Kp isolated between 2011 and 2013 in 21 French hospitals located in 10 of the 22 regions of France. We kept only the index isolate of each outbreak to get a better picture of the diversity of the strains. This represents approximately one-sixth of all the OXA-48-Kp identified in France during the study period. All the isolates were recovered from human samples (rectal screening or clinical samples). Twenty-eight (53%) of the patients travelled or were hospitalized in a foreign country in the previous 12 months and 15 (28%) did not travel abroad. The antibiotic susceptibility was determined by the disk diffusion method and the production of an extended-spectrum β -lactamase (ESBL) was detected by a synergy test [4]. We also determined the MICs of imipenem, meropenem and ertapenem using the strip-test (bioMérieux, La Balme-les-Grottes, France). The presence of *bla*_{OXA-48} was controlled in all isolates and *bla*_{ESBL} genes were identified in ESBL-producers by sequencing [5]. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was performed using the *Xba*I and multilocus sequence typing (MLST) was performed as previously described [6]. In order to build a dendrogram with the 1392 STs available at the time of the study, we concatenated the sequences of seven MLST genes to form a 3078-bp sequence alignment and define 930 polymorphic positions. The best-fit nucleotide substitution model for these data was GTR+G+I, as determined with jModelTest 0.1.1 [7]. We used *Escherichia coli* K12 as the outgroup strain. A maximum likelihood tree was constructed with RAxML 7.2.8 and visualized with Dendroscope [8].

According to the EUCAST guidelines, 93% of the 53 OXA-48-Kp isolates were non-susceptible to ertapenem, 23% non-susceptible to imipenem and 17% non-susceptible to

Abstract

We characterized 53 OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* (OXA-48-Kp) isolated between 2011 and 2013 in 21 French hospitals. All the isolates were genotyped using MLST and PFGE and the population structure of the species was determined by a nucleotide-based analysis of the entire *K. pneumoniae* MLST database. Most of the OXA-48-Kp isolates also produced CTX-M-15 and remained susceptible to imipenem and meropenem. The isolates were distributed into 20 STs, of which five were dominant (ST15, ST101, ST147, ST395 and ST405). All the OXA-48-Kp clustered in the major clade of *K. pneumoniae* KpI.

Keywords: Multidrug resistance, multilocus sequence typing, phylogenetic analysis

Original Submission: 4 April 2014; **Revised Submission:** 11 June 2014; **Accepted:** 15 June 2014

Editor: R. Cantón

meropenem. Most of the OXA-48-Kp isolates (42/53; 79%) produced an ESBL, with a large predominance of CTX-M-15 (40/42; 95%). The production of an ESBL was not linked to previous travel abroad. ESBL-producing OXA-48-Kp isolates were more frequently resistant to ertapenem, extended-spectrum cephalosporins, tobramycin and fluoroquinolones than non-ESBL-producers ($p < 0.01$).

The 53 OXA-48-Kp isolates were distributed into 20 STs. ST15 was the most frequent ST (14 isolates; 26%), followed by ST147 and ST395 (six isolates each; 11%) and ST101 and ST405 (five isolates each; 9%). ST17, ST48 and ST70 were represented by two isolates each. Other STs were represented by one isolate (ST37, ST45, ST231, ST307, ST336, ST589, ST663, ST1299, ST1300, ST1382 and ST1383). Isolates belonging to dominant STs (ST15, ST101, ST147, ST395, and ST405) were more likely to produce an ESBL (92% vs. 53%; $p < 0.001$) and more likely to be resistant to extended-spectrum cephalosporins, tobramycin and fluoroquinolones ($p < 0.01$) than isolates from non-dominant STs. Of interest, isolates from patients with a prior history of international travel were found in both dominant and non-dominant STs.

The phylogenetic tree built from the sequence data of the seven MLST genes of the 1392 STs of *K. pneumoniae* clearly showed three major clades, which correspond to the three major phylogenetic groups (KpI, KpII and KpIII) (Fig. 1). These

three clades have been previously defined by the comparison of *gyrA* and *parC* sequences [9]. The majority (75%) of the 1392 defined STs clustered into the clade KpI, which encompassed all the 53 OXA-48-Kp of the present study (Fig. 1).

Here we found that 79% of the emerging OXA-48-Kp in France additionally produced an ESBL, mostly of CTX-M-15-type. Such a proportion and the large predominance of CTX-M-15 have also been observed by Potron *et al.* [10] in an international collection. In our collection of OXA-48-Kp, the ESBL production was associated with a higher resistance to extended-spectrum cephalosporins and to fluoroquinolones. It is worth mentioning that 77% and 83% of our OXA-48-Kp remain susceptible to imipenem and meropenem, respectively. The analysis of MLST data revealed that a quarter of OXA-48-Kp belonged to ST15, while four other clones (ST101, ST147, ST395 and ST405) were represented each by five or six isolates. These STs are recognized as established 'international' clones that predominantly harboured *bla*_{ESBL} genes and less frequently carbapenemase-encoding genes. However, these clones have not yet had the epidemiological success of ST258, which drives the worldwide dissemination of *bla*_{KPC} [2]. Overall, this suggests that the spread of OXA-48-Kp combines the clonal expansion of successful STs and the dissemination of plasmid-borne *bla*_{OXA-48} among various strains of *K. pneumoniae*. Indeed, a

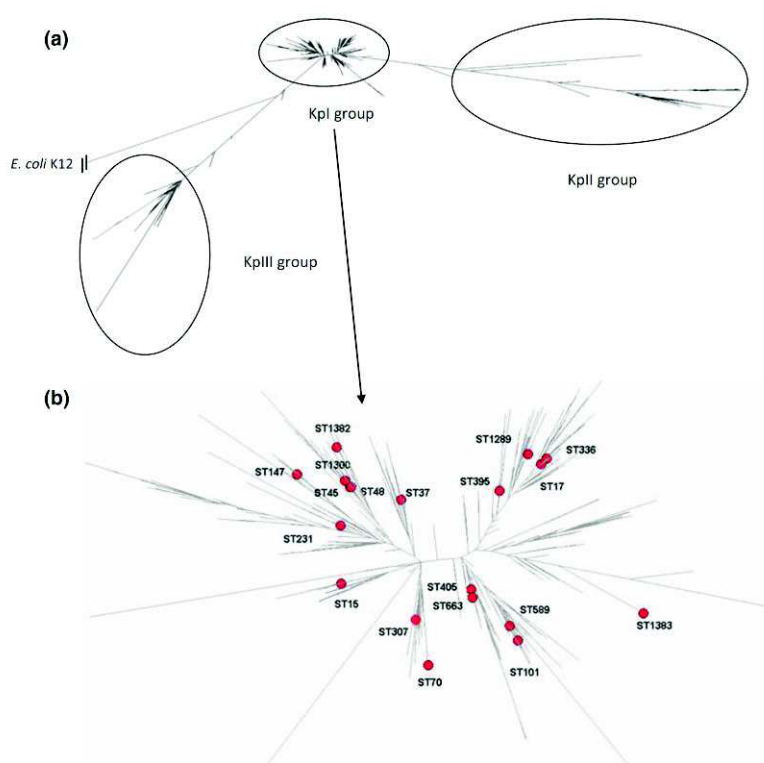


FIG. 1. Comparative analysis based on concatenated sequences of the seven housekeeping genes of the *Klebsiella pneumoniae* MLST scheme. (A) Clonal assignment of the STs in the entire *K. pneumoniae* MLST database ($n = 1392$ STs). (B) Close-up of the KpI group. The STs found in the present collection are represented with red spots.

62-kb self-conjugative IncL/M-type plasmid has been shown to contribute to the diffusion of *bla*_{OXA-48} in Europe [11]. Also, the genetic association of the *bla*_{CTX-M-15} and *bla*_{OXA-48} genes on mobile genetic elements, which may easily spread among *Enterobacteriaceae*, is a matter of concern [12].

The phylogenetic tree built with the whole MLST database reveals that all the STs recovered in this study clustered in the Kpl group, the clade that includes all the multidrug-resistant clinical isolates [13]. The scattering of our OXA-48 Kp isolates throughout the Kpl group suggests that the acquisition of *bla*_{OXA-48} is not associated with a subset of Kpl strains.

Interestingly, our study, together with the French national survey [14], shows that approximately one-quarter of OXA-48-Kp could be autochthonous (i.e. with no history of travel or hospitalization abroad) and independent from a previous hospitalization in a French hospital.

In conclusion, emergence and spread of OXA-48-Kp is nowadays a public health concern, because of therapeutic dead-ends and risk of transmission of the *bla*_{OXA-48} gene to commensal *E. coli* clones. The 'search and isolate' French policy regarding CPE in hospitals has been demonstrated to be an efficient tool until now because most of the reported CPE episodes remained sporadic. However, such infection control measures will be difficult to maintain if the amount of *bla*_{OXA-48} continues to increase.

Funding

This work was supported by the University Hospital of Besançon.

Acknowledgements

The authors would like to thank the biologists that participate in the Onerba networks and Fabrice Poncet from the sequencing facility of the SFR FED 4234 (University of Franche-Comté, Besançon).

Transparency Declaration

None to declare. We have not received the assistance of a professional medical writer or similar service for writing the manuscript.

References

1. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 1791–1798.
2. Canton R, Akova M, Carmeli Y *et al*. Rapid evolution and spread of carbapenemases among enterobacteriaceae in europe. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18: 413–431.
3. Vaux S, Carbonne A, Thiolet JM, Jarlier V, Coignard B. Emergence of carbapenemase-producing enterobacteriaceae in france, 2004 to 2011. *Euro Surveill* 2011; 16: pii=19880.
4. European committee on antimicrobial susceptibility testing (eucast 2013). Breakpoint tables for interpretation of mics and zone diameters. Version 3.0. Available at: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_3.1.pdf (last accessed 6 January 2014).
5. Potron A, Nordmann P, Lefeuvre E, Al Maskari Z, Al Rashdi F, Poirel L. Characterization of oxa-181, a carbapenem-hydrolyzing class d beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 4896–4899.
6. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PA, Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4178–4182.
7. Posada D. Jmodeltest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol* 2008; 25: 1253–1256.
8. Huson DH, Richter DC, Rausch C, DeZulian T, Franz M, Rupp R. Dendroscope: an interactive viewer for large phylogenetic trees. *BMC Bioinformatics* 2007; 8: 460.
9. Brisse S, Verhoef J. Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51: 915–924.
10. Potron A, Poirel L, Rondinaud E, Nordmann P. Intercontinental spread of oxa-48 beta-lactamase-producing enterobacteriaceae over a 11-year period, 2001 to 2011. *Euro Surveill* 2013; 18: pii=20549.
11. Patel G, Bonomo RA. "Stormy waters ahead": global emergence of carbapenemases. *Front Microbiol* 2013; 4: 48.
12. Potron A, Nordmann P, Rondinaud E, Jauregui F, Poirel L. A mosaic transposon encoding oxa-48 and *ctx-m-15*: towards pan-resistance. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68: 476–477.
13. Brisse S, van Himbergen T, Kusters K, Verhoef J. Development of a rapid identification method for *klebsiella pneumoniae* phylogenetic groups and analysis of 420 clinical isolates. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 942–945.
14. Institut national de veille sanitaire. Episodes impliquant des entérobactéries productrices de carbapénémases en france. Situation épidémiologique du 16 septembre 2013. Available at: <http://www.invs.santefr.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Infections-associees-aux-soins/Surveillance-des-infections-associees-aux-soins-IAS/Enterobacteries-productrices-de-carbapenemases-EPC> (last accessed 6 January 2014).

Publication n°6

Agabou A, Pantel A, Ouchenane Z, Lezzar N, Khemissi S, Satta D, Sotto A, Lavigne JP.

First description of OXA-48-producing *Escherichia coli* and the pandemic clone ST131 from patients hospitalised at a military hospital in Algeria.

Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014 Sep;33(9):1641-6.

First description of OXA-48-producing *Escherichia coli* and the pandemic clone ST131 from patients hospitalised at a military hospital in Algeria

A. Agabou · A. Pantel · Z. Ouchenane · N. Lezzar ·
S. Khemissi · D. Satta · A. Sotto · J.-P. Lavigne

Received: 9 March 2014 / Accepted: 9 April 2014 / Published online: 5 May 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract The aim of the study was to assess the frequency and diversity of carbapenemases and extended-spectrum β -lactamases (ESBL) produced by *Escherichia coli* isolates from patients hospitalised in the Regional Military Hospital of Constantine (Algeria). *E. coli* isolates were collected over a 2-year period from patients presenting *E. coli* infections. Strains with reduced susceptibility to ertapenem and/or positive for ESBL were characterised with regard to antibiotic resistance, *bla* genes, phylogenetic groups, O25 serotyping, quinolone resistance, repetitive sequence-based polymerase chain reaction (rep-PCR) profiles and multi-locus sequence typing (MLST). Of the 448 isolated *E. coli*, 94 (20.9 %) were multidrug-resistant. One of them (1.1 %) produced a *bla*_{OXA-48} and was identified as a B1 ST5 strain. The transposon bearing this gene was *Tn1999.2*. This strain was isolated from a patient coming from a border province with Tunisia, where this carbapenemase is endemic. In addition, 84 (18.8 %) isolates among them produced an ESBL with predominance

(97.6 %) of *bla*_{CTX-M-15}, which was coupled with *qnr* genes in 10.9 %. ESBL-producing strains were mainly detected in phylogroups D and A. They displayed 20 rep-PCR profiles and all the clonally related isolates were of the same sequence type (ST). Ten strains (9.4 %) belonged to the pandemic clone ST131. This study describes for the first time the presence of OXA-48-producing *E. coli* and the emergence of the inter-continental ST131 *bla*_{CTX-M-15}-producing *E. coli* strains in Algeria.

Introduction

The dissemination of multidrug-resistant *Escherichia coli* strains is considered a worldwide public health problem. Among the resistance mechanisms, CTX-M enzymes are now widespread in *E. coli*, leading to serious problems for the antimicrobial management of infections [1]. The broadly disseminated, CTX-M-15-positive *E. coli* clonal group (*E. coli* O25-ST131) has been described in different continents [2]. More recently, carbapenem-hydrolysing β -lactamases (A, B and D) have emerged and been reported extensively worldwide in *Enterobacteriaceae* [3]. Among these enzymes, OXA-48 is one of the latest reported carbapenemases and has been identified mostly from Mediterranean countries [4]. To date, this oxacillinase has been increasingly reported in Morocco and Tunisia [4, 5]. No report has described its presence in Algeria.

Materials and methods

Data collection and bacterial isolates

The study was carried out on non-repetitive *E. coli* isolates collected from 1st March 2011 until 31st December 2012 at

A. Agabou · N. Lezzar
Laboratoire de Recherche PADESCA, Institut des Sciences
Vétérinaires, Université de Constantine 1, Constantine, Algérie

A. Agabou · A. Pantel · A. Sotto · J.-P. Lavigne (✉)
Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1047,
Université Montpellier 1, UFR de Médecine, 186 Chemin du Carreau
des Lanes, CS83021, 30908 Nîmes cedex 01, France
e-mail: jphlavigne@hotmail.com

A. Pantel · J.-P. Lavigne
Service de Microbiologie, CHU Carémeau, 30029 Nîmes, France

Z. Ouchenane · S. Khemissi
Unité de Microbiologie, Hôpital Militaire Régional Universitaire de
Constantine, Constantine, Algérie

D. Satta
Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Département de
Biologie Animale, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie,
Université de Constantine 1, Constantine, Algérie

the Military Hospital of Constantine (North-East Algeria). All patients infected with multidrug-resistant *E. coli* were included. For patients with recurrent infections, only strains from the first episode were included. The following clinical data were collected: demographic data, clinical ward, diagnosis at admission, isolation site of bacteria, mono- or polymicrobial infection, clinical outcome, hospitalisation or surgical treatment in the last 12 months, transfer from another hospital, intensive care unit (ICU) or nursing home, and nosocomial or community-acquired infection. Patients were deemed to have community disease if the first culture found positive for *E. coli* was obtained within 48 h of admission. The bacterial genus and species were identified by conventional methods [API 20E (bioMérieux, France)] and all of the *E. coli* isolates were stored.

Susceptibility testing

Susceptibility to antimicrobial agents was tested by the disk diffusion assay on Mueller-Hinton agar according to recommendations of the Antibiotic Committee of the French Society for Microbiology (<http://www.sfm-microbiologie.org>). The Etest (bioMérieux) was used to determine the susceptibility to four carbapenems (ertapenem, imipenem, meropenem and doripenem). Extended-spectrum β -lactamase (ESBL) production was screened by the double-disk synergy test [6]. All *E. coli* isolates resistant to ertapenem and/or oxyiminocephalosporins were considered as multidrug-resistant.

Characterisation of resistance mechanisms

In all the studied strains, the genes coding for the most clinically prevalent carbapenemases (*bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} and *bla*_{NDM-1}) and ESBLs (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} and *bla*_{CTX-M}) were detected by polymerase chain reaction (PCR) using specific primers and identified by sequencing the PCR products [2, 7]. The *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* and *qepA* genes were screened by PCR in all of the quinolone-resistant isolates [8, 9].

rep-PCR profiles

For all multidrug-resistant *E. coli*, the genetic relationship was studied using the DiversiLab system (bioMérieux), a semi-automated fingerprinting tool based on repetitive sequence-based PCR (rep-PCR), by following the manufacturer's instructions. Isolates with identical strain patterns were considered indistinguishable if their similarity percentage was ≥ 95 %.

Phylogenetic and O grouping

Phylogenetic grouping and the O group of all the studied isolates were determined by PCR-based methods developed by Clermont et al. [10, 11].

Sequence type (ST) determination

Multi-locus sequence typing (MLST) was carried out according to Institut Pasteur's MLST scheme (<http://www.pasteur.fr/mlst>) on all the multidrug-resistant isolates.

The incompatibility group of the plasmid harbouring the *bla*_{OXA-48} gene was determined by PCR using previously published primers [12]. This gene is located between two identical insertion sequences, IS1999, forming the composite transposon *Tn*1999. The genetic structure surrounding this gene was determined by different PCRs and sequencing, as previously described [13].

Results

Main characteristics of patients and isolates

During the study period, 1,602 infections were diagnosed at the Military Hospital of Constantine. *E. coli* strains were isolated in 448 cases (28.0 % of all the identifications and 48.3 % of all the enterobacteria) and 94 of them were multidrug-resistant (20.1 %). They were mainly isolated from the urinary tract (38, 40.4 %) (Table 1). Among the 94 multidrug-resistant *E. coli* isolates, one exhibited resistance to ertapenem (1.1 % of the isolates). This strain carried the *bla*_{OXA-48} gene. It has been isolated from pus in a 78-year-old male admitted at the general surgery ward. This patient had been hospitalised for 16 days during March 2012. He came from a border province with Tunisia. During the studied period, the prevalence of ESBL production among the *E. coli* isolates was 18.8 % ($n=84$). The prevalence of CTX-M-producing *E. coli* within the total *E. coli* isolates was 18.3 % ($n=82$) and its occurrence among ESBL-producing strains was 97.6 %. CTX-M-15 was the only CTX-M-encoding gene in our study. We observed that 9 % of the CTX-M-producing strains were isolated in outpatients and most uropathogenic ESBL isolates were from females (80.6 %). The two remaining isolates carried *bla*_{TEM} genes (TEM-24 and TEM-3). Co-resistances to tobramycin (69.6 %), gentamicin (59.5 %), amikacin (3.6 %), cotrimoxazole (85.7 %) and ciprofloxacin (76.2 %) were observed. All these isolates were susceptible to carbapenems, fosfomycin and colistin.

Phylogenetic groups and molecular epidemiology of multidrug-resistant *E. coli*

The OXA-48-producing *E. coli* isolate belonged to the B1 phylotype and ST5 (Table 2). The plasmid harbouring the gene was IncL/M and the genetic environment of the *bla*_{OXA-48} gene corresponded to transposon *Tn*1999.2. The 84 ESBL-producing isolates were scattered among all four

Table 1 The main characteristics of the patients and multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates in Constantine, Algeria

Parameter	Patient with		
	<i>E. coli</i> with ESBL (<i>n</i> =84), <i>n</i> (%)	<i>E. coli</i> with OXA-48 (<i>n</i> =1)	Multidrug-resistant <i>E. coli</i> (<i>n</i> =94), <i>n</i> (%)
Age, median, years [range]	39.5 [0.25–78]	78	40.5 [0.25–78]
Male/female	36/48	1/0	41/53
Wards			
Medicine	23 (27.4)	–	30 (31.9)
Surgery	21 (25.0)	1	24 (25.5)
Paediatric	20 (23.8)	–	20 (21.3)
Emergency	10 (11.9)	–	10 (10.6)
ICU	7 (8.3)	–	7 (7.4)
Gynaecology	2 (2.4)	–	2 (2.1)
Oncology	1 (1.2)	–	1 (1)
Nosocomial/community origin	77/7	1/0	84/10
Source			
Pus	40 (47.6)	1	45 (47.8)
Urinary	33 (39.2)	–	38 (40.4)
Blood	4 (4.8)	–	4 (4.2)
Catheter	4 (4.8)	–	4 (4.2)
Respiratory tract	3 (3.6)	–	3 (3.1)
Presence of			
Urinary catheter	3 (3.6)	–	3 (3.1)
Tracheotomy	1 (1.2)	–	1 (1)
Central venous catheter	1 (1.2)	–	1 (1)
Associated resistance			
NAL	68 (81.0)	1	75 (79.8)
CIP	64 (76.2)	1	70 (74.4)
SXT	73 (86.9)	1	80 (85.1)
AMK	4 (4.8)	0	4 (4.2)
NET	27 (32.1)	0	29 (30.8)
TOB	58 (69.0)	1	62 (66.0)
GEN	50 (59.5)	1	54 (57.4)
MNO	30 (35.7)	1	32 (34.0)
FTN	2 (2.4)	0	2 (2.1)
FOS	0 (0)	0	0 (0)

ESBL: extended-spectrum β -lactamase; ICU, intensive care unit; NAL: nalidixic acid; CIP: ciprofloxacin; SXT: co-trimoxazole; AMK: amikacin; GEN: gentamicin; NET: netilmicin; TOB: tobramycin; GEN: gentamicin; MNO: minocycline; FTN: nitrofurantoin; FOS: fosfomycin

Table 2 The characteristics of OXA-48-producing, community-acquired *E. coli* isolates from surgical infections in Constantine, Algeria

Strain	Carbapenems MIC (μ g/mL)				Resistance phenotype	Phylogenetic group	Sequence type	β -lactamase content	Plasmid feature				Transposon bearing <i>bla</i> _{OXA-48}
	ERT	IPM	MER	DOR					RepA	TraU	ParA	Inc group	
CoEC290	0.75	0.38	0.25	0.125	KTG, NAL, OFX, CIP, MNO, SXT	B _I	ST5	TEM-1	+	+	+	L/M	Tn1999.2

ERT: ertapenem; IPM: imipenem; MER: meropenem; DOR: doripenem; K: kanamycin; T: tobramycin; G: gentamicin; NAL: nalidixic acid; OFX: ofloxacin; CIP: ciprofloxacin; MNO: minocycline; SXT: co-trimoxazole

major phylogenetic groups described in *E. coli*: 35.7 % belonged to D, 28.6 % to A, 19.0 % to B2 and 16.7 % to B1. rep-PCR revealed a great genomic diversity of the ESBL-producing *E. coli* isolates, as they were classified into 20 profiles (data not shown). However, rep-PCR also displayed four clusters (>95 % similarity) of CTX-M-producing isolates including five or more isolates (defined as major clonal groups): C₁ (*n*=14; phylogenetic group D), C_V (*n*=12; B2), C_{XIV} (*n*=8; A) and C_{XX} (*n*=10; D). The residual profiles contained two to four isolates (defined as minor clonal groups) (seven rep-PCR patterns) or single isolates. The OXA-48-positive strain did not correspond to any other strain. The four major clonal groups belonged to, respectively, sequence types ST3, ST131, ST2 and ST477, and the others were mainly of ST2, ST19, ST21, ST88, ST346, ST471 and ST472. No epidemiological links between patients could be demonstrated. Twelve CTX-M-15-producing isolates displayed serogroup O25. Among them, ten were B2 phylogroup and belonged to the intercontinental *E. coli* clone O25-ST131. They were mainly isolated from urinary tract infections (60 %). The two remaining O25-positive strains were of phylogroup D.

Plasmidic quinolone resistance

As a high level of nalidixic acid resistance (81.9 %) was observed in our population and a link between *bla*_{CTX-M} and *qnr* genes was described [14], we screened for the presence of *qnr* and *qepA* genes. The prevalence of *qnr* genes was 10.9 % of our CTX-M-producing *E. coli* isolates. The OXA-48-producing isolate did not harbour these genes but three isolates belonging to the international clone had them. *qnrB* and *qnrS* were identified in two and seven strains, respectively. These *qnr* genes were detected in six wards (especially paediatric wards, *n*=3) and one outpatient. No isolate carried the *qnrA* or *qepA* genes.

Discussion

This report documents, for the first time, the presence of the OXA-48 enzyme in *E. coli* in Algeria. This strain was singular and was not clonal with any other in-hospital or out-hospital strain. Recently, Baba Ahmed-Kazi Tani et al. found no OXA-48 producers in Tlemcen Hospital (West of Algeria) [15]. Nevertheless, Poirel et al. suggested that the OXA-48 enzyme may be endemic in Algeria, since its spread has been identified in different surrounding countries (Tunisia, Morocco and Libya) [4, 5, 16] and in the Mediterranean area (Spain, France, Italy, Egypt, Lebanon and Turkey) [3, 17–22]. However, in these cases, the enzyme was produced by *Klebsiella pneumoniae* strains and not *E. coli*. Interestingly, an OXA-48-producing *E. coli* was isolated in France from a patient

coming from Algeria, suggesting the emergence of this enzyme in this country [23]. *bla*_{VIM-19} was the only carbapenemase described to date in *Enterobacteriaceae* in Algeria. This enzyme, rarely described in Mediterranean countries, has been isolated at the ICU of the Central Military Hospital of Algiers [24].

Additionally, we observed a high prevalence of ESBL-producing *E. coli* isolates (18.8 %) and we detected, for the first time, the international clone O25-ST131 in ten isolates with a community origin in 40 %. The prevalence of ESBL varies across regions and hospitals (e.g. 21.7 % in Bologhine Hospital of Algiers) [25]. However, Ramdani-Bouguesla et al. reported a prevalence of around 8 % in 2006 at Mustapha Pacha Hospital of Algiers, demonstrating an increasing dissemination of these enzymes [26]. Compared to other Mediterranean countries, the recorded prevalence is equivalent to that found in Greece and Italy, but higher than France and Spain (<http://www.eucast.org>). Moreover, the emergence of several clones other than the ST131 clone is an interesting feature and underlines the worldwide problem of *bla*_{CTX-M} transfer between *E. coli* strains. It is worth noting that some of the *E. coli* STs identified in our study have been previously recorded. ST19 and ST88 have been reported from urinary tract infections [27, 28], whereas ST472 and ST477 are newly described as being related to *bla*_{CTX-M}, causing community-onset bacteraemia in Israel [29]. Nowadays, the ST21 *E. coli* strain harbouring the *stx2a* Shiga toxin-encoding gene is emerging in Europe [30].

The overall prevalence of *qnr*-encoding genes among our ESBL-producing isolates is lower than the rate of 18.7 % (with 6.2 % for QnrA and QnrS and 7.1 % for QnrB) reported by Bouchakour et al. in a Moroccan hospital and 26.6 % (with 16.6 % for QnrA, 23.3 % QnrB, 16.6 % for QnrS and 15 % for QepA) reported by Hassan et al. in different Egyptian health facilities [31, 32]. In Algeria, the *qnrB1* and *qnrS1* genes were described in *E. coli* and *E. cloacae* isolates [33, 34].

Conclusion

Our study confirms the alarming prevalence of plasmid-mediated resistance in Algeria and attests the serious worldwide problem of multidrug-resistant *Escherichia coli* strains. The presence of OXA-48-producing *E. coli* is a worrisome situation and suggests the need to screen and detect these enzymes to prevent and control their dissemination in this country.

Acknowledgements INSERM U1047 is supported by INSERM and Université de Montpellier 1.

Conflict of interest The authors report no conflicting interests.

References

- Cantón R, Coque TM (2006) The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* 9:466–475
- Nicolas-Chanoine MH, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso MP, Canica MM, Park YJ, Lavigne JP, Pitout J, Johnson JR (2008) Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother* 61:273–281
- Nordmann P, Naas T, Poirel L (2011) Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* 17:1791–1798
- Girlich D, Bouihath N, Poirel L, Benouda A, Nordmann P (2014) High rate of faecal carriage of extended-spectrum β -lactamase and OXA-48 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* at a University hospital in Morocco. *Clin Microbiol Infect* 20:350–354
- Saïdani M, Hammami S, Kammoun A, Slim A, Boutiba-Ben Boubaker I (2012) Emergence of carbapenem-resistant OXA-48 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Tunisia. *J Med Microbiol* 61:1746–1749
- Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A (1988) Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 10:867–878
- Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P (2011) Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 70:119–123
- Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, Soussy CJ, Nordmann P (2007) Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J Antimicrob Chemother* 60:394–397
- Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Arakawa Y (2008) Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 52:1564–1566
- Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E (2000) Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 66:4555–4558
- Clermont O, Johnson JR, Menard M, Denamur E (2007) Determination of *Escherichia coli* O types by allele-specific polymerase chain reaction: application to the O types involved in human septicemia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 57:129–136
- Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P (2012) Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother* 56:559–562
- Aubert D, Naas T, Héritier C, Poirel L, Nordmann P (2006) Functional characterization of IS1999, an IS4 family element involved in mobilization and expression of beta-lactam resistance genes. *J Bacteriol* 188:6506–6514
- Lavigne JP, Marchandin H, Delmas J, Bouziges N, Lecaillon E, Cavalie L, Jean-Pierre H, Bonnet R, Sotto A (2006) *qnrA* in CTX-M-producing *Escherichia coli* isolates from France. *Antimicrob Agents Chemother* 50:4224–4228
- Baba Ahmed-Kazi Tani Z, Decré D, Genel N, Boucherit-Otmani Z, Arlet G, Drissi M (2013) Molecular and epidemiological characterization of enterobacterial multidrug-resistant strains in Tlemcen Hospital (Algeria) (2008–2010). *Microb Drug Resist* 19:185–190
- Hammerum AM, Larsen AR, Hansen F, Justesen US, Friis-Møller A, Lemming LE, Fuursted K, Littauer P, Schønning K, Gahrn-Hansen B, Ellermann-Eriksen S, Kristensen B (2012) Patients transferred from Libya to Denmark carried OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae*, NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* 40:191–192
- Giani T, Conte V, Di Pilato V, Aschbacher R, Weber C, Larcher C, Rossolini GM (2012) *Escherichia coli* from Italy producing OXA-48 carbapenemase encoded by a novel *Tn1999* transposon derivative. *Antimicrob Agents Chemother* 56:2211–2213
- Kilic A, Aktas Z, Bedir O, Gumral R, Bulut Y, Stratton C, Tang YW, Basustaoglu AC (2011) Identification and characterization of OXA-48 producing, carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates in Turkey. *Ann Clin Lab Sci* 41:161–166
- Matar GM, Cuzon G, Araj GF, Naas T, Corkill J, Kattar MM, Nordmann P (2008) Oxacillinase-mediated resistance to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* from Lebanon. *Clin Microbiol Infect* 14:887–888
- Pitart C, Solé M, Roca I, Fàbrega A, Vila J, Marco F (2011) First outbreak of a plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing OXA-48 β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 55:4398–4401
- Poirel L, Abdelaziz MO, Bernabeu S, Nordmann P (2013) Occurrence of OXA-48 and VIM-1 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Egypt. *Int J Antimicrob Agents* 41:90–91
- Poirel L, Potron A, Nordmann P (2012) OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother* 67:1597–1606
- Potron A, Poirel L, Rondinaud E, Nordmann P (2013) Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* over a 11-year period, 2001 to 2011. *Euro Surveill* 18(31). pii: 20549
- Robin F, Aggoune-Khinache N, Delmas J, Naim M, Bonnet R (2010) Novel VIM metallo-beta-lactamase variant from clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Algeria. *Antimicrob Agents Chemother* 54:466–470
- Amhis W, Boudjelti I, Sahel N, Benbedka L, Benmesbah S, Hamzi W (2011) Prevalence and antibiotic resistance of the ESBL producing *Enterobacteria* strains isolated in Bologhine hospital during the years 2007–2010. *BMC Proc* 5:P136
- Ramdani-Bouguessa N, Mendonça N, Leitão J, Ferreira E, Tazir M, Canica M (2006) CTX-M-3 and CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamases in isolates of *Escherichia coli* from a hospital in Algiers, Algeria. *J Clin Microbiol* 44:4584–4586
- Seo MR, Kim J, Kim YJ, Wie SH, Cho YK, Lim SK, Lee JS, Kweon KT, Lee H, Cheong HJ, Park DW, Ryu SY, Pai H (2013) Characteristics of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* clones from community-acquired urinary tract infection in Korea. In: Abstracts of the 1st International Interscience Conference on Infection and Chemotherapy (ICIC 2013), Seoul, Korea, November 2013. Abstract A-017, p. 113. Korean Society of Infectious Diseases, Seoul, Korea
- Naseer U, Haldorsen B, Simonsen GS, Sundsfjord A (2010) Sporadic occurrence of CMY-2-producing multidrug-resistant *Escherichia coli* of ST-complexes 38 and 448, and ST131 in Norway. *Clin Microbiol Infect* 16:171–178
- Karfunkel D, Carmeli Y, Chmelnitsky I, Kotlovsky T, Navon-Venezia S (2013) The emergence and dissemination of CTX-M-producing *Escherichia coli* sequence type 131 causing community-onset bacteremia in Israel. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 32:513–521
- Bielaszewska M, Mellmann A, Bletz S, Zhang W, Köck R, Kossow A, Prager R, Fruth A, Orth-Höller D, Marejková M, Morabito S, Caprioli A, Piérard D, Smith G, Jenkins C, Curová K, Karch H (2013) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11/H-: a new virulent clone emerges in Europe. *Clin Infect Dis* 56:1373–1381
- Bouchakour M, Zerouali K, Gros Claude JD, Amarouch H, El Mdaghri N, Courvalin P, Timinouni M (2010) Plasmid-mediated quinolone resistance in expanded spectrum beta lactamase producing *Enterobacteriaceae* in Morocco. *J Infect Dev Ctries* 4:799–803
- Hassan WM, Hashim A, Domany RA (2012) Plasmid mediated quinolone resistance determinants *qnr*, *aac(6′)-Ib-cr*, and *qep* in ESBL-producing *Escherichia coli* clinical isolates from Egypt. *Indian J Med Microbiol* 30:442–447

33. Gharout-Sait A, Touati A, Benallaoua S, Guillard T, Brasme L, Madoux J, De Champs C (2012) CTX-M from community-acquired urinary tract infections in Algeria. *Afr J Microbiol Res* 6: 5306–5313
34. Iabadene H, Messai Y, Ammari H, Ramdani-Bouguessa N, Lounes S, Bakour R, Arlet G (2008) Dissemination of ESBL and Qnr determinants in *Enterobacter cloacae* in Algeria. *J Antimicrob Chemother* 62:133–136

Publication n°7

Agabou A, Lezzar N, Ouchenane Z, Khemissi S, Satta D, Sotto A, Lavigne JP, Pantel A.

Clonal relationship between human and avian ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* isolated in North-Eastern Algeria.

Acceptée dans Eur J Clin Microbiol Infect Dis (EJCM-D-15-00838R1).

Clonal relationship between human and avian ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* isolates in North-eastern Algeria

Amir Agabou • Nawel Lezzar • Zouleikha Ouchenane • Salim Khemissi • Dalila Satta • Albert Sotto • Jean-Philippe Lavigne • Alix Pantel

A. Agabou • A. Sotto • A. Pantel • J-P. Lavigne (✉)

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1047, Université Montpellier, Nîmes, France

E-mail : jean.philippe.lavigne@chu-nimes.fr

A. Agabou • N. Lezzar

Laboratoire PADESCA, Institut des Sciences Vétérinaires, Université des frères Mentouri, Constantine, Algérie

Z. Ouchenane • S. Khemissi

Laboratoire de microbiologie, Hôpital Militaire Régional Universitaire de Constantine, Algérie

D. Satta

Laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire, Département de biologie animale, Faculté des sciences de la nature et de la vie, Université des frères Mentouri, Constantine, Algérie

A. Sotto

Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, CHU Carémeau, Nîmes University Hospital, Nîmes, France

JP. Lavigne • A. Pantel

Service de Microbiologie, CHU Carémeau, Nîmes University Hospital, Nîmes, France

Running title: Genetic links among avian and human *E. coli* isolates

Abstract

Purpose: The objectives of this study were to determine rates, patterns and mechanisms of antibiotic resistance and to assess connections between chicken commensal, human commensal and pathogenic ciprofloxacin-resistant *E. coli* isolates.

Methods: All *E. coli* isolates collected from chickens, their farmers and patients in Constantine region (North-east Algeria) were analyzed for *bla* and plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes contents, phylogroups, Rep-PCR profiles and Multilocus Sequence Types.

Results: A high prevalence of resistance to fluoroquinolones (51.4% to ciprofloxacin) was recorded in avian isolates. 22.2% of them carried the *aac(6')-Ib-cr* gene, whereas lower resistance levels to these antibiotics were recorded in chicken farmers' isolates. None of the commensal isolates harbored the *qnr*, *qepA* or *oqxAB* genes. One human pathogenic isolate was ertapenem-resistant and harbored the *bla*_{OXA-48} gene, 84 showed an extended-spectrum β -lactamase phenotype with *bla*_{CTX-M-15} gene prevalent in 87.2% of them. Seventy isolates were resistant to fluoroquinolones with *aac(6')-Ib-cr* present in 72.8%, *qnrB* in 5.7% and *qnrS* in 10%. Three Rep-PCR profiles were common to chicken commensal and human pathogenic isolates (phylogroups D and B1; ST21, ST48 and ST471, respectively), one was found in both chicken and chicken-farmer commensal strains (D; ST108) while another profile was identified in a chicken-farmer commensal strain and a human pathogenic one (B1; ST19).

Conclusion: These findings suggest clonal and epidemiologic links between chicken and human ciprofloxacin-resistant *E. coli* isolates and the important role that poultry may play in the epidemiology of human *E. coli* infections in Constantine region.

Key words: *Escherichia coli*, chicken, farmers, hospital, drug resistance, clonality

Introduction

Escherichia coli are commensal bacteria found in the gastrointestinal tract of humans and many animal species. However, some strains are pathogenic and frequently encountered in clinical practice. In poultry production, colibacillosis (caused by avian pathogenic *E. coli*: APEC) continues to be a devastating disease all over the world.

Antimicrobial therapy is an important tool to reduce both the incidence of this pathology and its economic impact [1]. Nevertheless, used therapeutically or given sub-therapeutically as feed additives, antibiotics seem to have a profound impact on the development of antibiotic resistance in commensal bacteria, which are potential genetic partners in the transfer of resistance genes to pathogenic ones [2, 3]. Since many years, the multiplication of bacterial resistance to antibiotics in animals has become a major concern in both animal and public health, as resistant bacteria can pass through the food chain to people [4]. In several surveys, the use of antibiotics in animal production has been held responsible for the increase of rebellious human infections due to resistant bacteria. The association between deficiency in new marketed antibiotics and accelerated evolution of bacterial resistance in both animals and humans represents a real "emergency" and is more considered as an ecosystem problem especially for commensal microfloras [5].

Many studies demonstrated that some APEC strains could belong to the same clones as human extraintestinal pathogenic ones (ExPEC) and may act as potential pathogens for humans as they often possess similar virulence genes [6-9]. However, few studies have been investigating the relationship between avian non clinical bacteria and human pathogenic ones. The present study was designed to assess in details rates, patterns and mechanisms of antibiotic resistance in chicken commensal, human commensal and pathogenic *E. coli* strains in Constantine region (North-East of Algeria) and to evaluate the connection between them.

Material and methods

Chickens and chickens farmers' commensal isolates

Fourteen independent farms keeping chicken flocks (A to N, aged of 35 days or more) from various regions of Constantine were randomly enrolled from March 2011 through December 2012. On each farm, a mixture of 20 fresh poultry droppings was collected as well as a stool sample from consenting chicken farmer. At the laboratory, samples were diluted and cultured on MacConkey agar (bioMerieux, France). Suspected colonies were identified using the API

20E system (BioMérieux) and from each sample five *E. coli* colonies were arbitrarily selected for antibiotic susceptibility testing.

The following information were also recorded: flock size, age, health status and antibiotics used for birds, other animals kept at the farm, recent hospital stay and antibiotics taken by poultry farmers, their family members or their companion animals during the last three months.

Human pathogenic isolates

We selected 94 (consecutive non repetitive) human pathogenic *E. coli* isolates obtained from various clinical samples and collected from different wards of the Military Hospital of Constantine from March 2011 to December 2012. Epidemiological and clinical data were collected for each patient.

Antimicrobial susceptibility testing and ESBL detection

All isolates were subjected to susceptibility testing against 31 selected antibiotics important in clinical practice by the disc diffusion method. Results were interpreted according to the SFM/EUCAST recommendations [<http://www.sfm-microbiologie.org>]. ESBL-production was screened by the double-disk synergy test and fluoroquinolones-resistant isolates were selected for further molecular analyses at the INSERM U1047 (France).

Characterization of β -lactamase-encoding and PMQR genes

Plasmid or chromosomal DNA was extracted from the isolates using the EZ1 DNA Tissue kit on the BioRobot EZ1 extraction platform (QIAGEN, France). Genes encoding for the most clinically prevalent carbapenemases (*bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, and *bla*_{NDM}) and ESBLs (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, and *bla*_{CTX-M}) were detected by PCR and confirmed by sequencing the PCR products [10-12]. Similarly, plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qepA*, *aac(6')-Ib-cr* and *oqxAB*) were screened and confirmed (by PCR and sequencing) in all the quinolones-resistant isolates [13-16].

Phylotyping and O25b subgrouping

Phylogenetic groups of the *E. coli* isolates and the O25b subgroup of the ESBL-producers were determined by PCR as previously described [17, 18].

Clonality analysis

The genetic relationship of all the human and avian ciprofloxacin-resistant isolates was studied using Rep-PCR (DiversiLab system, bioMérieux). Isolates with identical patterns were considered indistinguishable if their similarity percentage was $\geq 95\%$.

MLST

Multilocus sequence typing (MLST) was carried out by PCR amplification and sequencing of eight housekeeping genes: *dinB*, *icdA*, *pabB*, *polB*, *putP*, *trpA*, *trpB* and *uidA*. Allelic profile and sequence type determinations were assigned according to the Institut Pasteur's MLST web site scheme (www.pasteur.fr/mlst).

Statistical analysis

Comparisons of antimicrobial resistance rates distribution and the resistance genes characteristics of the different *E. coli* isolated from poultry (**P**), their farmers (**F**) and clinical samples (**C**) were performed by calculating Fisher's exact test (at 95 % CI and $p < 0.05\%$) using SAS/ETS[®] version 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2004).

Results

Drug resistance profiles and phylogenetic grouping in chicken commensal E. coli

The resistance phenotypes confirmed that among the 70 avian commensal *E. coli*, 44.3% (belonging to all flocks except B and F) were resistant to three or more antimicrobial classes. Resistance levels to nalidixic acid (88.6%), ofloxacin (80%) and ciprofloxacin (51.4%) were very frequent and all the strains were susceptible to 3rd generation cephalosporins and many other antibiotics (Table 1).

Among the ciprofloxacin-resistant isolates (n=36) none harbored *qnr*, *qepA* or *oqxAB* genes, but 22.2% of them carried *aac(6')-Ib-cr* gene. These isolates were distributed among the four main phylogenetic groups: B1 (41.7%), D (30.6%), A (25%) and B2 (2.7%) (Table 2). They were detected from all the poultry farms except the F one and 59.6% of them belonged to flocks where quinolones had not been used.

Drug resistance profiles and phylogenetic grouping in chicken farmers commensal E. coli

These isolates showed lower resistance levels to nalidixic acid (15.7%), ofloxacin (11.4%) and ciprofloxacin (5.7%) and all were susceptible to 3rd generation cephalosporins and other drugs (Table 1). None of the chicken farmers was treated with antibiotics and 64.3% of them had pets.

Half of the ciprofloxacin-resistant isolates were collected from farmers who did not use these drugs for their poultry. These isolates harboured no PMQR genes. They belonged to phylogroups A (25%), B1 (25%) and D (50%) (Table 2) and were isolated in poultry farms B, D, F and N.

Drug resistance profiles and phylogenetic grouping in human pathogenic E. coli

Among the 94 clinical isolates, one exhibited resistance to ertapenem (1.1%), 84 (89.4%) showed an ESBL phenotype and 70 (74.5%) were insensitive to ciprofloxacin.

Resistance to antibiotics was significantly more prevalent in clinical isolates than in farmers or poultry isolates (22/31 antibiotics tested) in particular to ciprofloxacin ($p < 0.001$) (Table 1).

The ertapenem-resistant strain harboured the *bla*_{OXA-48} gene in association with *bla*_{TEM-1} and *aac*(6')-Ib-cr. Among the 84 ESBL-producers, 82 harboured the *bla*_{CTX-M-15} gene and the two remaining strains carried *bla*_{TEM-24} and *bla*_{TEM-3}. These ESBLs were significantly associated with strains isolated from patients ($p < 0.001$). 78.1% of the *bla*_{CTX-M-15}⁺ isolates showed co-resistance to ciprofloxacin (Table 2).

aac(6')-Ib-cr gene was identified in 51 (72.9%) ciprofloxacin-resistant strains, *qnrS* in seven (10%) and *qnrB* in five (7.1%). The presence of *aac*(6')-Ib-cr gene was significantly associated with clinical strains as compared to poultry or farmer ones ($p < 0.001$). The *qnr*⁺ strains also harboured *aac*(6')-Ib-cr gene in 6 of *qnrS*⁺ and 2 of *qnrB*⁺ strains. Ciprofloxacin-resistant isolates were scattered among the four major phylogenetic groups: D (40%), A (24.3%), B1 (18.6%) and B2 (17.1%) (Table 2).

Clonality analysis and MLST of ciprofloxacin-resistant E. coli strains

The obtained dendrogram showed that the 110 fluoroquinolones-resistant isolates were grouped in 38 Rep-PCR patterns (data not shown). Only seven profiles included five or more isolates: patterns XXIII (n=14; phylogroup D; ST3), XXXIII (n=13; B2; ST43), VI (n=10, B1; ST471), XXXVI (n=10; D; ST477), XIII (n=8; A; ST2), XVI (n=5; A; ST2), and XIX (n=5; A; ST347). The residual patterns contained two to four isolates (10 Rep-PCR patterns)

or single isolates (21 Rep-PCR patterns). Cluster of the sixth profile was very diverse, intermixing isolates of different origins (Hospital and several farms: A, C, D and J) and all the clonally related isolates (determined by Rep-PCR) were of the same sequence-type defined by MLST. Three clonal groups (VI, X and XXXI) connected chicken commensal isolates to human pathogenic ones. They belonged to phylotypes B1 and D and ST21, ST48 and ST471 (Fig. 1). One pattern (XXX) was common to chicken and chicken-farmer commensal strains (D; ST108) and another (I) was identified in a chicken-farmer commensal strain and a human pathogenic one (B1; ST19) (Fig. 1). The clustered isolates exhibited slight variations independently of their origin, year of isolation, resistance pattern or sample nature. This suggests a link between the poultry *E. coli* isolates and the humans' ones.

All the 12 human B2 O25b-ST131 strains did not cluster with any avian strain suggesting the absence of any chicken reservoir for this worldwide clone. The same observation could be made for the *bla*_{OXA-48}⁺ strain that belonged to ST5.

Discussion

The findings of the present study provide evidence of a genetic homogeneity and a clonal link between *E. coli* from poultry, farmers and clinical cases in Constantine region suggesting that avian commensal, human commensal and pathogenic strains are from the same origin. However, the exact routes of transmission remain uncertain.

Chicken-to-human transmission of bacteria during farming has been largely demonstrated. Johnson *et al.* [19, 20] showed that ciprofloxacin-resistant *E. coli* strains from human blood and fecal samples were almost identical to resistant isolates from geographically linked chickens whereas drug-susceptible human *E. coli* strains were genetically distinct from avian ones, suggesting a possible dissemination via the poultry. *E. coli* strains could also be transmitted from poultry to humans through meat consumption and environmental contamination with manure or faeces of wild or domestic birds [21, 22]. Another route of antimicrobial-resistant *E. coli* entry into the community is through occupational exposure to *E. coli* from live-animal contact in the broiler chicken industry [23]. This had been confirmed by our findings, as we observed clonality between chicken and chicken farmers' strains, and between the latter and human pathogenic ones.

The sporadic nature and the appearance of new pathogenic *E. coli* strains by virtue of novel STs suggests that these strains may be commensal that have acquired the antibiotic resistance encoding plasmids (especially ESBL) [24]. This is in agreement with our findings as we observed clonality between a *bla*_{CTX-M-15}⁺ ExPEC strain and one chicken-farmer commensal strain and another *bla*_{CTX-M-15}⁺ ExPEC strain with two chickens commensal ones (Fig. 1). Acquisition of resistance genes may also be accounted for the differences in drug resistance between our clonal avian-human strains and clonal commensal-pathogenic strains as the drug selection pressure in clinical environments is the major cause of the accumulation of resistance determinants against antibiotics. According to Kolar *et al.* [25], β -lactamases of the *bla*_{CTX-M-9} group are the most frequently found in poultry. *bla*_{OXA-48} had been reported in *K. pneumoniae* and *E. cloacae* from companion animals (especially dogs, cats and horses) but not birds [26].

Ciccozzi *et al.* [27] suggested that the potential transmission of multidrug resistant *E. coli* clones from poultry to humans seems to involve phylogroups A and B1 rather than B2 and D. Phylogroups A and B1 are known to be broad host-spectrum and could be found in all vertebrate hosts whereas B2 and D are narrow host-spectrum and largely restricted to endothermic vertebrates with B2 isolates as the most host adapted [28]. In the adaptation process, mutation is the main driving evolutionary course in the *E. coli* group A whereas recombination is more prevalent in B1, B2 and D [29]. Phylogroups A, B1 and D are more likely to have derived from the ancestral *E. coli* lineages [30, 31] and the minor genetic differences observed between strains from the different source groups could be related to their further evolutionary changes associated with host specificity [32]. This is another explanation of our results as we found clonal human and avian strains belonging mainly to phylogroups B1 and D.

Interestingly, we did not find any correlation between the most important worldwide drug-resistant and virulent *E. coli* O25:H4-B2-ST131 clone (mainly responsible of urinary tract infections) and any avian strains. This is an important finding since the ST131 clone has been previously isolated from clinical cases and the environment in Algeria [33, 34]. In contrast, a 90.9% similarity was found between avian and human O25b:H4-ST131 *ibeA*-*bla*_{CTX-M-9}⁺ strains in Spain [35]. According to Giufrè *et al.* [36] and Cortès *et al.* [37], ST131 clone is strongly predominant in human ciprofloxacin-resistant *E. coli* strains, but less in

avian ones in which it has not necessary to produce an ESBL and the acquisition of these enzymes encoding plasmids was probably achieved in a later stage of its evolution [35, 38, 39]. The fact that a big number of our ExPEC isolates belong to clusters exclusive to humans suggests that most of human pathogenic strains may not be derived from extra-human (avian) ones. However the clonality among several avian and human isolates supports the idea of their evolution from a recent common ancestor.

Conforming to Lee *et al.* [40], most fluoroquinolone-resistant *E. coli* in poultry are commensals that harbour mutations in *gyrA* or less frequently *parC*. These chromosomally encoded genes have not been investigated in our study and instead we focused on PMQRs because of plasmids' extreme flexibility in the acquisition and transfer of resistance. The same ciprofloxacin-resistant strains common in both chickens and humans could also be acquired from the environment or from companion animals (dogs and cats) [26, 41].

Conclusion

This study highlights a genetic proximity among avian commensal, human commensal and pathogenic *E. coli* strains suggesting that poultry may play an important role in the epidemiology of human *E. coli* infections in Constantine region. These findings may help us to understand the acquisition and the evolution of antimicrobial resistance and may therefore help us to block its transmission pathways. Efforts are required (i) to understand the ecology of bacterial communities present in animals and their environments and (ii) to elucidate the transmission dynamics to humans.

Acknowledgments

This work was supported by INSERM and A. AGABOU had obtained an AVEROES scholarship. We thank Mariella Lomma for her help in editing assistance.

Competiting interests

The authors report no conflicting interests.

References

1. Geomaras I, Hastings JW, Holy A (2004) Genotypic analysis of *Escherichia coli* strains from poultry carcasses and their susceptibilities to antimicrobial agents. *Appl Environ Microbiol* 67: 1940-1944.
2. Smith JL, Drum DJV, Dai Y, Kim JM, Sanchez S, Maurer JJ, Hofacre CL, Lee MD (2007) Impact of antimicrobial usage on antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* strains colonizing broiler chickens. *Appl Environ Microbiol* 73: 1404-1414.
3. Schjørring S, Krogfeldt KA (2011) Assessment of bacterial antibiotic resistance transfer in the gut. *Int J Microbiol* 2011: 312956.
4. Manges AR, Johnson JR (2012). Food-borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *Clin Infect Dis* 55: 712-719.
5. Wang HH (2009) Commensal bacteria, microbial ecosystems, and horizontal gene transmission: adjusting our focus for strategic breakthroughs against antibiotic resistance. In : Jaykus LA, Wang HH, Schlesinger LS (ed) *Food-Borne Microbes: Shaping the Host Ecosystem*. ASM Press, Washington DC, pp 267-281.
6. White DG, Dho-Moulin M, Wilson RA, Whittam TS (1993) Clonal relationships and variation in virulence among *Escherichia coli* strains of avian origin. *Microb Pathog* 14: 399-409.
7. Johnson TJ, Kariyawasam S, Wannemuehler Y, Mangiamiele P, Johnson SJ, Doetkott C, Skyberg JA, Lynne AM, Johnson JR, Nolan LK (2007) The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes. *J Bacteriol* 189: 3228-3236.
8. Ewers C, Antao EM, Diehl I, Philipp HC, Wieler LH (2009) Intestine and environment of the chicken as reservoirs for Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential. *Appl Environ Microbiol* 75: 184-192.
9. Mora A, López C, Dabhi G, Blanco M, Blanco JE, Alonso MP, Herrera A, Mamani R, Bonacorsi S, Moulin-Schouleur M, Blanco J (2009) Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O1:K1:H7/NM from human and avian origin: Detection of clonal groups B2 ST95 and D ST59 with different host distribution. *BMC Microbiol* 7: 9:132.
10. Pitout JD, Hanson ND, Church DL, Laupland KB (2004) Population-based laboratory surveillance for *Escherichia coli*-producing extended-spectrum beta-lactamases: importance of community isolates with *bla*CTX-M genes. *Clin Infect Dis* 38: 1736-1741.
11. Kim J, Lim YM, Jeong YS, Seol SY (2005) Occurrence of CTX-M-3, CTX-M-15, CTX-M-14 and CTX-M-9 extended-spectrum beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* clinical isolates in Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 1572-1575.
12. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P (2011) Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 70: 119-123.
13. Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC (2006) Prevalence in the United States of *aac(6')-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 3953-3955.

14. Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, Soussy CJ, Nordmann P (2007) Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J Antimicrob Chemother* 60: 394-397.
15. Yamane K, Wachino JI, Suzuki S and Arakawa Y (2008) Plasmid-mediated QepA gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 1564-1566.
16. Liu BT, Wang XM, Liao XP, Sun J, Zhu HQ, Chen XY (2011) Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *oqxAB* and *aac(6')-Ib-cr* and extended-spectrum beta-lactamase gene *bla*CTX-M-24 co-located on the same plasmid in one *Escherichia coli* strain from China. *J Antimicrob Chemother* 66: 1638-1639.
17. Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM (2013) The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylogroups. *Environ Microbiol Rep* 5: 58-65.
18. Clermont O, Dhanji H, Upton M, Gibreel T, Fox A, Boyd D, Mulvey MR, Nordmann P, Ruppé E, Sarthou JL, Frank T, Vimont S, Arlet G, Branger C, Woodford N, Denamur E (2009) Rapid detection of the O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* encompassing the CTX-M-15-producing strains. *J Antimicrob Chemother* 64: 274-277.
19. Johnson JR, Kuskowski MA, Menard M, Gajewski A, Xercavins M, Garau J (2006) Similarity between human and chicken *Escherichia coli* isolates in relation to ciprofloxacin resistance status. *J Infect Dis* 194: 71-78.
20. Johnson JR, Sannes MR, Croy C, Johnston B, Clabots C, Kuskowski MA, Bender J, Smith KE, Winokur PL, Belongia EA (2007) Antimicrobial drug-resistant *Escherichia coli* from humans and poultry products, Minnesota and Wisconsin, 2002-2004. *Emerg Infect Dis* 13: 838-846.
21. Duffy G (2003) Verocytotoxic *Escherichia coli* in animal faeces, manures and slurries. *J Appl Microbiol* 94: 94s-103s.
22. Jakobsen L, Kurbasic A, Skjøl-Rasmussen L, Ejrnaes K, Porsbo LJ, Pedersen K, Jensen LB, Emborg HD, Agersø Y, Olsen KE, Aarestrup FM, Frimodt-Møller N, Hammerum AM (2010) *Escherichia coli* isolates from broiler chicken meat, broiler chickens, pork, and pigs share phylogroups and antimicrobial resistance with community-dwelling humans and patients with urinary tract infection. *Foodborne Pathog Dis* 7: 537-547.
23. Price LB, Graham JP, Lackey LG, Roess A, Vailes R, Silbergeld E (2007) Elevated risk of carrying gentamicin-resistant *Escherichia coli* among U.S. Poultry Workers. *Environ Health Perspect* 115: 1738-1742.
24. Karfunkel D, Carmeli Y, Chmelnitsky I, Kotlovsky T, Navon-Venezia S (2013) The emergence and dissemination of CTX-M-producing *Escherichia coli* sequence type 131 causing community-onset bacteremia in Israel. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 32: 513-521.
25. Kolar M, Bardon J, Chroma M, Hricova K, Stosova T, Sauer P, Koukalova D (2010) ESBL and AmpC beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in poultry in the Czech Republic. *Vet Med Czech* 55: 119-124.
26. Schmiedel J, Falgenhauer L, Domann E, Bauerfeind R, Prenger-Berninghoff E, Imirzalioglu C, Chakraborty T (2014) Multiresistant extended-spectrum β -lactamase-

producing *Enterobacteriaceae* from humans, companion animals and horses in central Hesse, Germany. BMC Microbiol 12; 14:187.

27. Ciccozzi M, Giufrè M, Accogli M, Lo Presti A, Graziani C, Cella E, Cerquetti M (2013) Phylogenetic analysis of multidrug-resistant *Escherichia coli* clones isolated from humans and poultry. New Microbiol 36: 385-394.

28. Gordon DM, Cowling A (2003) The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. Microbiol 149: 3575-3586.

29. Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler LH, Karch H, Reeves PR, Maiden MCJ, Ochman H, Achtman M (2006) Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. Mol Microbiol 60: 1136-1151.

30. Escobar-Páramo P, Grenet K, Le Menac' A, Rode L, Salgado E, Amorin C, Gouriou S, Picard B, Rahimy MC, Andremout A, Denamur E, Ruimy R (2004) Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates. Appl Environ Microbiol 70: 5698-5700.

31. Yang Z (2007) PAML 4: Phylogenetic analysis by maximum likelihood. Mol Biol Evol 24: 1586-1591.

32. Bettelheim KA, Ismail N, Shinbaum R, Shooter RA, Moorhouse E, Farrell W (1976) The distribution of serotypes of *Escherichia coli* in cow-pats and other animal material compared with serotypes of *E. coli* isolated from human sources. J Hyg (Lond) 76: 403-406.

33. Agabou A, Pantel A, Ouchenane Z, Lezzar N, Khemissi S, Satta D, Sotto A, Lavigne JP (2014) First description of OXA-48-producing *Escherichia coli* and the pandemic clone ST131 from patients hospitalised at a military hospital in Algeria. Eur J Clin. Microbiol Infect Dis 33: 1641-1646.

34. Brahmi S, Dunyach-Rémy C, Touati A, Lavigne JP (2015) CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and the pandemic clone O25b-ST131 isolated from wild fish in Mediterranean Sea. Clin Microbiol Infect 21: e18-e20.

35. Mora A, Herrera A, Mamani R, Lopez C, Pilar Alonso M, Blanco JE, Blanco M, Dahbi G, García-Garrote F, Pita JM, Coira A, Bernardez MI, Blanco J (2010) Recent emergence of clonal group O25b:K1:H4-B2-ST131 *ibeA* strains among *Escherichia coli* poultry isolates, including CTX-M-9-producing strains, and comparison with clinical human isolates. Appl Environ Microbiol 76: 6991-6997.

36. Giufrè M, Graziani C, Accogli M, Luzzi I, Busani L, Cerquetti M (2012) *Escherichia coli* of human and avian origin: detection of clonal groups associated with fluoroquinolone and multidrug resistance in Italy. J Antimicrob Chemother 67: 860-867.

37. Cortés P, Blanc V, Mora A, Dahbi G, Blanco JE, Blanco M, López C, Andreu A, Navarro F, Alonso MP, Bou G, Blanco J, Llagostera M (2010) Isolation and characterization of potentially pathogenic antimicrobial-resistant *Escherichia coli* strains from chicken and pig farms in Spain. Appl Environ Microbiol 76: 2799-2805.

38. Johnson JR, Murray AC, Gajewski A, Sullivan M, Snippes P, Kuskowski MA, Smith KE (2003) Isolation and molecular characterization of nalidixic acid-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from retail chicken products. Antimicrob Agents Chemother 47: 2161-2168.

39. Peirano G, Pitout JD (2010) Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M beta-lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4. *Int J Antimicrob Agents* 35: 316-321.
40. Lee YJ, Cho JK, Kim KS, Tak RB, Kim AR, Kim JW, Im SK, Kim BH (2005) Fluoroquinolone resistance and *gyrA* and *parC* mutations of *Escherichia coli* isolated from chicken. *J Microbiol* 43: 391-397.
41. Miles TD, McLaughlin W and Brown PD (2006) Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from broiler chickens and humans. *BMC Veterinary Research* 2:7.

Table 1 Resistance profiles of *E. coli* isolated from poultry (P), their farmers (F) and patients (C).

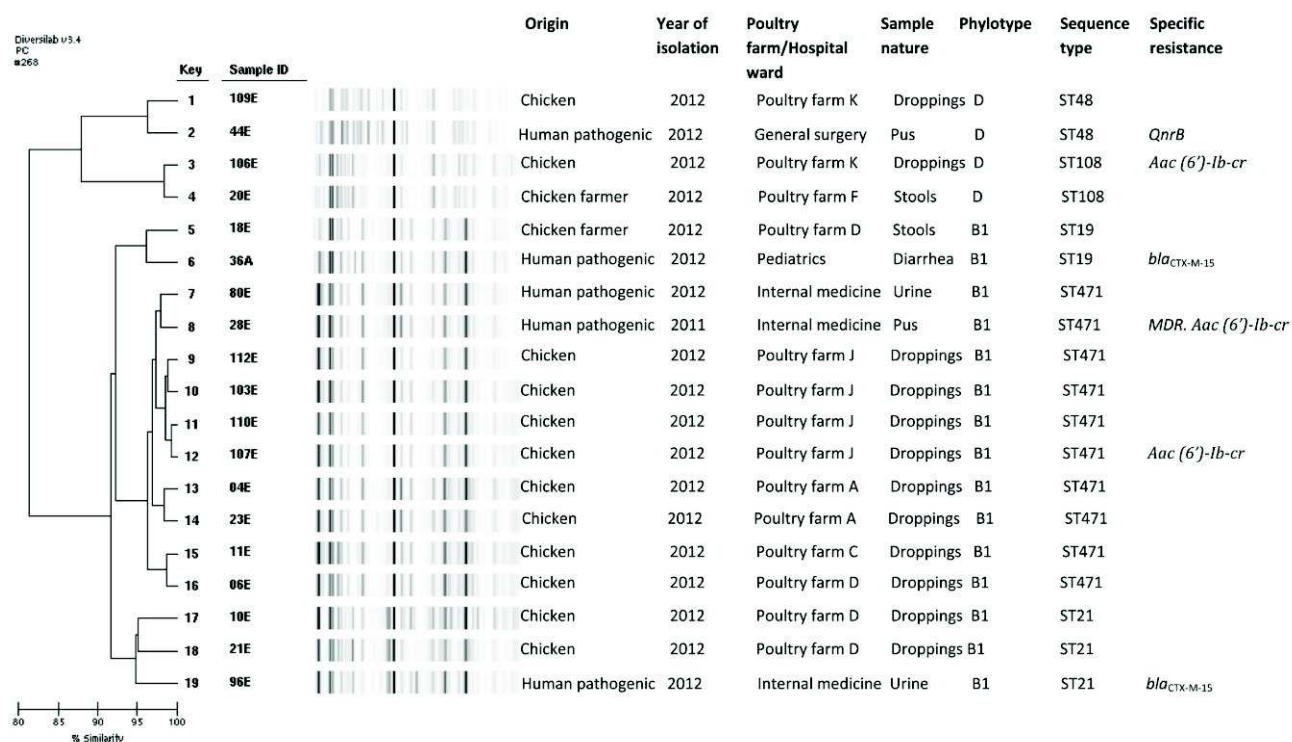
Antibiotics	Origin of isolates			<i>p</i>		
	Poultry	Farmers	Clinical samples	P vs F	P vs C	F vs C
	(N=70) n (%)	(N=70) n (%)	(N=94) n (%)			
Amoxicillin	55 (78.5)	10 (14.3)	93 (98.9)	<0.001	<0.001	<0.001
Ticarcillin	55 (78.5)	10 (14.3)	93 (98.9)	<0.001	<0.001	<0.001
Piperacillin	3 (4.3)	0 (0)	92 (97.8)	NS	<0.001	<0.001
Amoxicillin/clavulanic acid	0 (0)	0 (0)	76 (80.8)	NS	<0.001	<0.001
Ticarcillin/clavulanic acid	2 (2.9)	1 (1.4)	83 (88.3)	NS	<0.001	<0.001
Piperacillin/tazobactam	0 (0)	1 (1.4)	8 (8.5)	NS	NS	NS
Cefalotin	0 (0)	0 (0)	88 (93.6)	NS	<0.001	<0.001
Cefamandole	3 (4.3)	0 (0)	90 (95.7)	NS	<0.001	<0.001
Ceftazidime	0 (0)	0 (0)	78 (82.9)	NS	<0.001	<0.001
Cefotaxime	0 (0)	0 (0)	87 (92.5)	NS	<0.001	<0.001
Cefepime	0 (0)	0 (0)	76 (80.8)	NS	<0.001	<0.001
Cefoxitin	0 (0)	0 (0)	17 (18.1)	NS	<0.001	<0.001
Cefixime	0 (0)	0 (0)	82 (87.2)	NS	<0.001	<0.001
Aztreonam	0 (0)	0 (0)	84 (89.3)	NS	<0.001	<0.001
Mecillinam	16 (22.8)	3 (4.3)	68 (72.3)	0.002	<0.001	<0.001
Moxalactam	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NS	NS	NS
Ertapenem	0 (0)	0 (0)	1 (1.1)	NS	NS	NS
Imipenem	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NS	NS	NS
Meropenem	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NS	NS	NS
Amikacin	0 (0)	0 (0)	4 (4.2)	NS	NS	NS
Netilmicin	0 (0)	0 (0)	29 (30.8)	NS	<0.001	<0.001
Tobramycin	0 (0)	0 (0)	62 (65.9)	NS	<0.001	<0.001
Gentamicin	0 (0)	0 (0)	54 (57.4)	NS	<0.001	<0.001
Nalidixic acid	62 (88.7)	11 (15.7)	75 (79.7)	<0.001	NS	<0.001
Ofloxacin	56 (80)	8 (11.4)	74 (78.7)	<0.001	NS	<0.001
Ciprofloxacin	36 (51.4)	4 (5.7)	70 (74.4)	<0.001	0.003	<0.001
Minocycline	8 (11.4)	0 (0)	32 (34.1)	<0.001	0.001	<0.001
Cotrimoxazole	58 (82.8)	9 (12.9)	80 (85.1)	<0.001	NS	<0.001
Nitrofurantoin	2 (2.9)	2 (2.9)	2 (2.1)	NS	NS	NS
Fosfomycin	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NS	NS	NS
Colistin	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NS	NS	NS

Table 2 Resistance genes characteristics of ciprofloxacin-resistant *E. coli* strains from poultry, their farmers and patients.

	Origin of isolates			<i>p</i>		
	Poultry (P)	Farmers (F)	Clinical samples (C)	P vs F	P vs C	F vs C
	(N=36) n (%)	(N=4) n (%)	(N=70) n (%)			
ESBL genes						
<i>bla</i> _{CTX-M-15}	0 (0)	0 (0)	65 (92.8)	NS	<0.001	<0.001
<i>bla</i> _{TEM-24}	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NS	NS	NS
<i>bla</i> _{TEM-3}	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NS	NS	NS
Carbapenemase genes						
<i>bla</i> _{OXA-48}	0 (0)	0 (0)	1 (1.4)	NS	NS	NS
PMQR genes						
<i>qnrA</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NS	NS	NS
<i>qnrB</i>	0 (0)	0 (0)	5 (7.1)	NS	NS	NS
<i>qnrS</i>	0 (0)	0 (0)	7 (10)	NS	NS	NS
<i>qepA</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NS	NS	NS
<i>oqxAB</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NS	NS	NS
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	8 (22.2)	0 (0)	51 (72.8)	NS	<0.001	<0.001
Phylogenetic group						
A	9 (25)	1 (25)	17 (24.3)	NS	NS	NS
B1	15 (41.6)	1 (25)	13 (18.5)	NS	NS	NS
B2	1 (2.7)	0 (0)	12 (17.1)	NS	NS	NS
D	11 (15.7)	2 (50)	28 (40)	NS	NS	NS
O25b-ST131 clone	0 (0)	0 (0)	12 (17.1)	NS	0.007	0.007

Figure Legend

Figure 1. DiversiLab dendrogram representing the clonal strains with their corresponding characteristics



Publication n°8

Clarivet B, Pantel A, Morvan M, Parer S, Jumas-Bilak E, Lotthé A. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: use of a dynamic registry of cases and contacts for outbreak management.

J Hosp Infect. 2015 Sep 28 [Epub ahead of print].

Available online at www.sciencedirect.com

Journal of Hospital Infection

journal homepage: www.elsevierhealth.com/journals/jhin

Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: use of a dynamic registry of cases and contacts for outbreak management

B. Clarivet^a, A. Pantel^{b,c}, M. Morvan^a, H. Jean Pierre^d, S. Parer^{a,e},
E. Jumas-Bilak^{a,e}, A. Lotthé^{a,e,*}

^aDepartment of Infection Control and Prevention, University Hospital of Montpellier, France

^bDepartment of Microbiology, University Hospital of Nîmes, France

^cINSERM U1047 Nîmes, UFR Medecine, University of Montpellier, France

^dDepartment of Bacteriology–Virology, University Hospital of Montpellier, France

^eTeam Pathogènes Hydriques Santé Environnement, UMR 5569 HydroSciences Montpellier, Unité de Bactériologie, UFR Pharmacie, University of Montpellier, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 April 2015

Accepted 29 July 2015

Available online xxx

Keywords:

Carbapenemase-producing

Enterobacteriaceae

Database

Outbreak management

Registry

SUMMARY

Background: The emergence and spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) have become a major public health problem. Control and prevention of CPE infections hinge on isolation precautions for carriers and active screening and follow-up of contacts.

Aim: To implement an open registry of cases and contacts for acute outbreak management, long-term data collection and epidemiological investigation.

Methods: All cases, defined as patients (infected or colonized) with a CPE-positive culture during their hospitalization, and contacts (e.g. patients cared for by the same healthcare team as a case) were registered in an ongoing database. Hospital stays were cross-referenced for every new entry and epidemiological links (e.g. shared contacts) investigated. All cases and contacts not cleared by complete screening were registered on an active list.

Findings: Between October 2012 and November 2014, we registered 30 cases and 1268 contacts, among which 24 were linked to two or three separate cases. Only 6.5% of contacts fulfilled complete screening with three rectal swabs, and 1145 contacts are still registered on the active surveillance list. Two outbreaks (12 and nine cases) occurred nine months apart. Cross-referencing of hospital stays using the registry revealed epidemiological links between seemingly unrelated cases of CPE-positive patients and suggested an environmental source of transmission, which was demonstrated thereafter.

Conclusion: We implemented a simple and multi-purpose tool to manage CPE episodes and investigate epidemiological links. Efforts are necessary to improve screening of contact patients who may be occult sources of transmission. A regional registry could be helpful.

© 2015 Published by Elsevier Ltd on behalf of the Healthcare Infection Society.

* Corresponding author. Address: Département d'Hygiène Hospitalière, CHRU de Montpellier, Hôpital Saint Eloi, 34 295 Montpellier cedex 5, France. Tel.: +33 04 67 33 76 26.

E-mail address: a-lotthe@chu-montpellier.fr (A. Lotthé).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2015.07.007>

0195-6701/© 2015 Published by Elsevier Ltd on behalf of the Healthcare Infection Society.

Introduction

Carbapenems are antimicrobials of last resort used to treat severe infections caused by multidrug-resistant organisms (MDROs). During the last decade, carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) have emerged and spread worldwide, becoming a public health problem. Acquisition of these bacteria is mostly nosocomial but community-acquired CPE have also been described.^{1–6} In Europe, endemicity of CPE infections has been reported for three countries (Greece, Italy, and Malta) and in France the number of CPE episodes notified to the French Institute for Public Health Surveillance (InVS) has increased from 10 in 2009 to 405 in 2013.^{7,8} Containing the spread of these bacteria is therefore a priority, and guidelines for infection control and prevention measures have been published in many countries.⁹ All of them recommend active screening of high-risk patients (such as travellers having received medical attention abroad) and putting suspected or confirmed CPE carriers under contact precautions. The French guidelines additionally recommend assigning dedicated healthcare teams to cases and contacts.¹⁰ The latter are defined as all patients cared for by the same healthcare professionals as a case, albeit part time. All contacts must be traced and screened, by three weekly stool or rectal swabs, before being cleared and allowed to transfer. In case of discharge home before full screening, an alert must be kept on the patient, who shall require contact precautions and screening completion whenever (and wherever) next hospitalized. This involves rigorous follow-up and information to caregivers for all uncleared contacts.

Practical implementation of these guidelines can prove difficult. Indeed, different databases are needed for different phases of case or outbreak management: one to identify and screen contacts at the time of the alert and one for long-term follow-up of cases and contacts when patients return to hospital. Moreover, considering patients' frequent transfers between different healthcare facilities, there is a need to centralize information.

The aim of this study was to design and implement an open registry of cases and contacts, which could be used as a tool for long-term data collection and patient follow-up, acute outbreak management (contact tracing), and investigation of transmission links.

Methods

Settings

The University Hospital of Montpellier, France, is a 2600-bed tertiary care teaching hospital organized in five distinct sites, providing medical, surgical, obstetrical, psychiatric and long-term care, as well as seven intensive care units (ICUs). In 2013, there were 222,491 hospitalizations. The infection control team comprises 1.6 full-time doctors and seven nurses. The Nîmes University Hospital reference laboratory for CPE identification performs prospective genotyping of all strains isolated in the region.

MDRO surveillance and control policy

A systematic screening for MDRO [nasal and rectal swabs for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae respectively] is performed for all patients admitted to ICU for more than 48 h and once weekly thereafter. In other units, screening is warranted in patients presenting risk factors (history of previous MDRO carriage, transfer from a long-term care facility, chronic wounds and/or indwelling medical device). A daily automatic report from the microbiology laboratory informs the infection control team of MDRO-positive clinical or screening samples. MDRO-positive patients are put under contact precautions for the duration of their hospitalization.

MDRO presenting a resistance profile suggestive of CPE are submitted to microbiological investigations as described.¹¹ Patients transferred from a foreign hospital or with a previous hospitalization abroad in the last 12 months are screened for MDRO, including CPE upon admission. In this study, CPE strains of the same species and displaying the same resistotype were compared by repetitive sequence-based polymerase chain reaction (rep-PCR) using the DiversiLab® system (bio-Mérieux, Marcy l'Etoile, France).¹² Isolates that clustered >95% were considered related.

Study definitions

The cases were defined as patients with a CPE-positive culture from any infected or colonized site during their hospitalization. An outbreak was defined as at least two CPE cases linked by an epidemiological chain of transmission: an index case followed by one or more secondary case(s). When cross-transmission was suspected, microbiological confirmation was required. A sporadic case was defined as an index case (with or without secondary cases) that could not be linked to an epidemiological source; hence all sporadic cases were deemed imported, even if diagnosed more than 48 h after admission.

The contacts were the patients cared for by the same healthcare team as a case. Microbiological screening of contact patients (repeat weekly rectal or stool swabbing) was undertaken until three negative results were obtained, and contact precautions maintained for these contact patients until clearance. In case of unavoidable transfer to another healthcare facility, information was passed to continue screening and contact precautions. In case of discharge home of an uncleared contact, screening and contact precautions were resumed upon re-hospitalization.

Registry design

The registry was adapted from the InVS tool used for surveillance of an episode of CPE. It is an Excel® ongoing database (see Supplementary material online) composed of four sheet tabs:

- The 'cases' sheet contains information on CPE cases (personal and demographic data, hospitalization abroad, bacteriological data, etc.).

Table 1

Characteristics of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE)-positive patients identified in the University Hospital of Montpellier between October 2012 and November 2014

Characteristics	Cases (N = 30)
Sex	
Male	18 (60%)
Female	12 (40%)
Age (years), median (range)	63 (10–85)
Link with a foreign country	8 (26.7%)
Types of cases (global)	
Sporadic	18 (60%), of which 15 remained single cases
Hospital-acquired (secondary cases)	12 (40%)
Outbreaks	
November 2012 to February 2013	2 index cases (different clones) 10 (2 + 8) secondary cases
October 2013	1 index case 2 secondary cases
Bacterial strains	
OXA-48: <i>K. pneumoniae</i>	28 (93.3%)
OXA-48: <i>E. coli</i>	1 (3.3%)
NDM-1: <i>E. coli</i>	1 (3.3%)
Length of stay (days) in a hospital unit, median (range)	11 (1–104)
Clinical infections ^a	7 (23.3%)
Urinary tract infection	3 (10.0%)
Septicaemia	1 (3.3%)
Osteitis	1 (3.3%)
Spondylodiscitis	1 (3.3%)
Pulmonary infection	2 (6.7%)

^a One case had both pulmonary and urinary tract infections with CPE.

- The ‘cases hospital stay’ sheet lists each hospital stay, identified by an administrative record number. Every stay is characterized in terms of space (hospitalization ward, room number), time (dates of stay, delay between positivity and contact precautions) and control measures implemented.
- The ‘contacts’ sheet includes all contacts of each case. Every contact is linked to a hospital stay of a case and duplicates are automatically highlighted (contacts linked to several cases). There is an automatic calculation of time lapse (+ or –) between first contact and first positive case-finding and information about the follow-up is recorded: transfers, screening results, etc.
- The ‘active list’ sheet retains contacts still under surveillance (incompletely screened).

A simplified file is used to manage an episode at the time of the occurrence.

Ethical considerations

The registry is managed exclusively by the infection control team within the hospital information system. Since no nominative information is transmitted, authorization from the French National Commission for Information Technology and

Liberties (CNIL) is not required. As for all diagnostic procedures, patients undergoing MDRO screening give informed consent, and results are consigned in the medical file.

Results

Use of the registry as a database

Between October 1st, 2012 and November 1st, 2014, 30 CPE-positive patients were identified in the University Hospital of Montpellier and recorded in the registry. Eighteen cases were deemed sporadic, three of whom generated secondary cases. In all, 15 patients were involved in outbreaks. Eight cases (26.7%) had travelled abroad in the previous 12 months, six of whom had had contact with a foreign healthcare system. These eight patients amounted to 44.4% of the 18 sporadic cases. Cases’ characteristics and microbiology are summarized in Table 1. Two outbreaks occurred in November 2012 and October 2013 and involved respectively 12 and three patients, among which 12 were hospital-acquired secondary cases.

In all, 1268 contacts were registered. Twenty-four had contact with more than one case and 84 patients (6.5%) fulfilled complete screening (three negative rectal swabs).

Since the implementation of the registry, 123 contacts have been removed from the ‘active contacts’ file: 83 were cleared after complete screening showed them negative, 28 died, and 12 developed CPE carriage, thus becoming cases. The ongoing contact follow-up is still open for 1145 contacts. The database is used to check on patients’ status transferred from our institution, when required by other hospitals.

Use of the registry as a tool for acute episode management

For each detected CPE case, immediate contact mapping was performed by downloading from the hospital information system all patients once or still on the same ward as the case within defined dates of exposure. Centralizing all past and present contacts in the same database allowed daily monitoring of their screening results at a glance, thus facilitating in-hospital follow-up. In all, 487 contacts (38.4%) had already been discharged at the time of case diagnosis, among which 69 (14.2%) were located and screened at least once. Contacts discharged home were not recalled. The registry recorded an average of 42.3 contacts per case (up to 133 contacts for one case). The median length of contact with a case was three days (range: 1–43).

Use of the registry as an investigation tool

The registry was used to detect possible chains of transmission by highlighting contacts linked to several cases (hypothesizing that incompletely screened contacts could be a source of transmission) and by longitudinal cross-referencing of hospital stays (cases and contacts). Specifically, we sought an epidemiological link between the sporadic cases that occurred in 2013: indeed, none had been in contact with a known CPE carrier or a foreign country, and some of them had had previously negative MDRO screenings. A molecular comparison of regional CPE strains was performed by the regional reference laboratory. This revealed that four of our ‘sporadic’ cases

(including the index case of the second outbreak) were clonal, despite having no apparent link with one another. Cross-referencing of hospital stays using the registry highlighted that the four cases had occupied the same room in a neuro-surgery ICU, albeit over several months and without overlapping. The epidemic strain was isolated from the faucet of that room, and no new case was detected in our hospital after replacement of that water outlet (unpublished data).

Discussion

Our study shows how a dynamic registry of CPE cases and contacts can be an asset in a healthcare facility. As an ongoing database, it provides IC teams with the data required to involve hospital management in the logistic and financial effort needed to implement control measures.¹³ As an outbreak management tool, it is useful in defining risk levels of exposure by highlighting multiple contacts, calculating contact duration and delay before implementation of control measures. Indeed, rapid identification and screening of contacts is essential to limit the spread of CPE.¹⁴ Another key measure is long-term follow-up with re-admission alerts of CPE carriers and uncleared contacts.¹⁰ Carmeli *et al.* recommend an active surveillance of high-risk patients and an ongoing surveillance with prospective data collection and daily census of CPE carriers.¹³ Our registry thus provides a list of cases and uncleared contacts whose medical file bears an infection control 'flag' notifying the need to implement contact precautions and screening for CPE in case of readmission, in compliance with current recommendations.¹⁵

Besides being a dynamic database, the registry can help identify possible transmission links: by tracking sporadic cases' movements within our hospital, our registry revealed that they had stayed in one particular room, thus leading to the discovery of a persistent environmental source of *K. pneumoniae* OXA-48. It is considered that CPE outbreaks occur preferentially in hospitals because selection and transmission are easier than in the community, reflecting longer transmission chains.¹⁶ Molecular epidemiology of circulating bacterial strains, as performed in France by regional reference laboratories, supplements classical epidemiology in the investigation of transmission routes between seemingly unrelated cases. In our region, *K. pneumoniae* OXA-48 is the most frequent CPE and ST101 the most prevalent clone; this clone has been described in several Mediterranean countries.^{11,13,17} In our study about half the index cases were linked to a foreign country. This rate is comparable to that reported at regional and national levels.^{8,11} It seems that the proportion of episodes unrelated to foreign travel or residency is on the increase: this could suggest the beginning of a community spread in France.⁸ Our report shows that in-hospital investigation is, however, always necessary, as some hidden epidemiological links can be discovered, especially if there is no obvious importation.

The major limitation of our registry is that data are 'human-monitored'. This can be challenging when, because of the delay before CPE diagnosis, a case has generated many contacts (up to 133 in our study). Contact tracing is resource consuming, and many patients were lost to follow-up. A majority of contacts remain unscreened or incompletely screened and their exposure to CPE is not always notified in their medical file. One way to improve transmission of information and

follow-up would be to have a regional registry: making the database available at a regional level would allow all health-care facilities to check whether an admitted patient is not a CPE carrier or an incompletely screened contact. Further development of the registry should involve interfaces with the hospital information system for automated contact tracing and readmission alerts and large-scale, non-nominative databanks for population-based studies on CPE transmission routes.

In conclusion, in need of a large-scale database for increasing numbers of patients requiring follow-up, we have implemented a simple, effective, low-cost, multi-purpose computerized tool. As we showed for an environmental source, such a registry may be helpful to detect unsuspected transmission routes and reservoirs of CPE, thereby improving our knowledge on CPE persistence in the environment.

Conflict of interest statement

None declared.

Funding sources

None.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material (online only) for this article includes facsimile EXCEL files showing how the registry (ongoing database) and contact management tools are constructed. Note that the Contact Management file is presented with hidden columns which will automatically unfold when the table is copy-pasted into the registry. Also note that automatic calculations are built into the Contact Management file but not the registry: downloading of contact data into the database should be done when follow-up is completed or acute epidemic management is over.

Supplementary data related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2015.07.007>.

References

1. Patel G, Bonomo RA. "Stormy waters ahead": global emergence of carbapenemases. *Front Microbiol* 2013;4:48.
2. Cantón R, Akova M, Carmeli Y, *et al.* Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:413–431.
3. Perry JD, Naqvi SH, Mirza IA, *et al.* Prevalence of faecal carriage of Enterobacteriaceae with NDM-1 carbapenemase at military hospitals in Pakistan, and evaluation of two chromogenic media. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:2288–2294.
4. Nordmann P, Couard J-P, Sansot D, Poirel L. Emergence of an autochthonous and community-acquired NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Europe. *Clin Infect Dis* 2012;54:150–151.
5. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clin Microbiol Infect* 2013;20:821–830.
6. Ruppé E, Armand-Lefèvre L, Estellat C, *et al.* Acquisition of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae by healthy travelers to India, France, February 2012 to March 2013. *Strain* 2014;19(14). pii: 20768.
7. Glasner C, Albiger B, Buist G, *et al.* Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: a survey among national experts from 39 countries, February 2013. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull* 2013;18(28).
8. Episodes impliquant des entérobactéries productrices de carbapénèmes en France. Situation épidémiologique du 4 septembre

- 2014./Entérobactéries productrices de carbapénèmases (EPC)/Surveillance des infections associées aux soins (IAS)/Infections associées aux soins/Maladies infectieuses/Dossiers thématiques/Accueil. 2014. Available from: <http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Infections-associees-aux-soins/Surveillance-des-infections-associees-aux-soins-IAS/Entero-bacteries-productrices-de-carbapenemases-EPC/Episodes-impliquant-des-enterobacteries-productrices-de-carbapenemases-en-France.-Situation-epidemiologique-du-4-septembre-2014> [last accessed August 2015].
9. Savard P, Carroll KC, Wilson LE, Perl TM. The challenges of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and infection prevention: protecting patients in the chaos. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2013;**34**:730–739.
 10. Haut Conseil de la Santé Publique. *Recommandations pour la prévention de la transmission croisée des "Bactéries Hautement Résistantes aux antibiotiques émergentes" (BHRe)*. 2013 July.
 11. Pantel A, Boutet-Dubois A, Jean-Pierre H, et al. French regional surveillance program of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli: results from a 2-year period. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014;**33**:2285–2292.
 12. Pantel A, Marchandin H, Prère M-F, et al. Faecal carriage of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli in hospital settings in southern France. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015;**34**:899–904.
 13. Carmeli Y, Akova M, Cornaglia G, et al. Controlling the spread of carbapenemase-producing Gram-negatives: therapeutic approach and infection control. *Clin Microbiol Infect* 2010;**16**:102–111.
 14. Fournier S, Monteil C, Lepointeur M, et al. Long-term control of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae at the scale of a large French multihospital institution: a nine-year experience, France, 2004 to 2012. *Euro Surveill* 2014;**19**(19). pii=20802.
 15. Neulier C, Audry-Blanchard A, Lucas R, Merrer J, Hilaire J-C. Apport de l'informatique hospitalière à la gestion d'une épidémie d'entérobactéries porteuses de carbapénémase. *Hygiènes* 2013;**21**:145–150.
 16. Grundmann H, Livermore DM, Giske CG, et al. Carbapenem-non-susceptible Enterobacteriaceae in Europe: conclusions from a meeting of national experts. *Euro Surveill* 2010;**15**(46). pii=19711.
 17. Potron A, Poirel L, Rondinaud E, Nordmann P. Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae over an 11-year period, 2001 to 2011. *Euro Surveill* 2013;**18**:1–13.

Publication n°9

Pantel A, Richaud-Morel B, Cazaban M, Bouziges N, Sotto A, Lavigne JP.

Environmental persistence of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in a French Intensive Care Unit.

Am J Infect Control. 2015 Oct 30 [Epub ahead of print].



Contents lists available at ScienceDirect

American Journal of Infection Control

journal homepage: www.ajicjournal.org

Brief report

Environmental persistence of OXA-48–producing *Klebsiella pneumoniae* in a French intensive care unitAlix Pantel PharmD^{a,b}, Brigitte Richaud-Morel PharmD^c, Michel Cazaban MD^c,
Nicole Bouziges MD^{a,b}, Albert Sotto MD, PhD^{a,d}, Jean-Philippe Lavigne MD, PhD^{a,b,*}^aInstitut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université of Montpellier, Nîmes, France^bDepartment of Microbiology, Caremeau University Hospital, Nîmes, France^cDepartment of Infection Control, Caremeau University Hospital, Nîmes, France^dDepartment of Infectious Diseases, Caremeau University Hospital, Nîmes, France

Key Words:
Carbapenemase
Enterobacteriaceae
Persistence
France
Environment
OXA-48
Klebsiella pneumoniae

The spread of carbapenemase-producing Gram-negative rods is an emerging global problem. This study describes the epidemiologic features of an outbreak caused by an environmental reservoir of OXA-48–producing *Klebsiella pneumoniae* caused by persistence of the bacteria during 20 months in an intensive care unit in France. This report emphasizes the importance of early environmental screening to interrupt the transmission of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*.

Copyright © 2015 by the Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology, Inc.
Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

The spread of carbapenemases in Gram-negative bacilli leading to extremely drug-resistant (XDR) bacteria is a major concern worldwide. Among these carbapenemases, infections involving OXA-48–producing *Klebsiella pneumoniae*, since their first description in 2001 in Turkey, have increasingly been reported across Mediterranean countries.¹ To date, they are the most common carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) in France.² Many outbreaks occurred in the South of France, a critical area at the crossroad between Europe and North Africa.³ Hospitals have been frequently associated with a reservoir for nosocomial pathogens.⁴ Recently, environmental contamination by CPE has been also reported.⁵

MATERIALS AND METHODS

Investigations of an outbreak were initiated in the intensive care unit (ICU) at Nîmes University Hospital (South of France) on June 2012 and were carried out until March 2014. The investigation

included all patients infected or colonized with carbapenem-resistant *K pneumoniae*. Surveillance for CPE rectal carriage was performed on admission in all high-risk patients (defined as patients who either were transferred from a foreign hospital or hospitalized abroad during the previous year). If a case was identified, CPE screening was extended to contact patients the following days and once weekly for 3 weeks. Contact patients were defined as patients present on the same date and managed by the same nursing staff. Dedicated nursing staff were made available as soon as possible (mean time, 2 ± 1 days). During the investigation for potential environmental sources, the following different sites were examined: ventilation system, sink drains, amounts and barriers of beds, mattress covers, doors, windows, trolleys, racks, respirators (rear and filter), soap holders, and towels. A 10- × 10-cm area of each location was swabbed. For smaller surfaces, the entire site was swabbed. CPE screening was performed using Drigalski medium (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) supplemented with a 10-μg disk of ertapenem; chromID OXA-48 and chromID CARBA media (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) were used. Bacterial identification was performed using the Vitek2 system (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Antimicrobial susceptibility was determined by the disk diffusion method according to European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing guidelines (www.sfm-microbiologie.org). The genotypic characterization of β-lactams resistance was determined with Check-MDR CT102 microarray (Check Point; Biocentric, Bandol, France).⁶ For all of the carbapenemases detected, the amplified genes were sequenced using

* Address correspondence to Jean-Philippe Lavigne, MD, PhD, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1047, UFR de Médecine, CS83021, Chemin du Carreau de Lanes, 30908 Nîmes Cedex 02, France.

E-mail address: jean.philippe.lavigne@chu-nimes.fr (J.-P. Lavigne).

Previous presentations: Presented to the Congress of French Society of Hygiene, June 2015, Tours, France.

Funding/Support: Supported by the National Institute of Health and Medical Research.

Conflicts of interest: None to report.

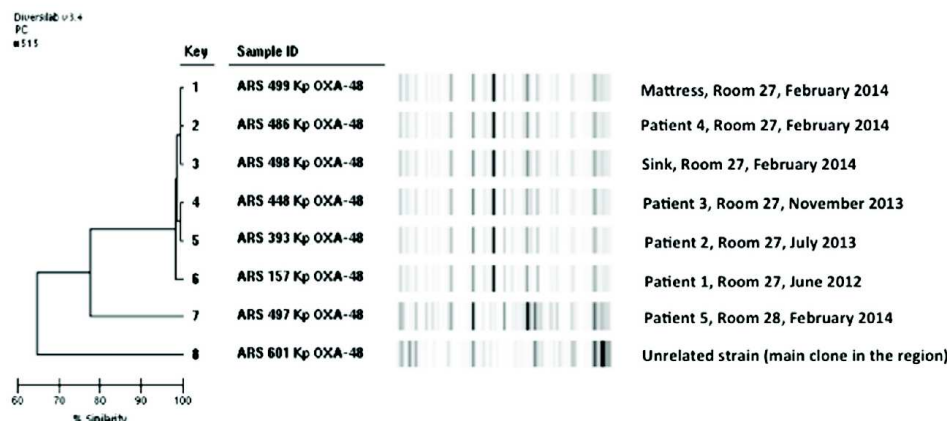


Fig 1. Clonality analysis (repetitive polymerase chain reaction) of environmental and clinical OXA-48–producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in the intensive care unit at Nîmes University Hospital (June 2012–February 2014).

specific primers.⁷ Plasmids-mediated resistance to aminoglycosides and quinolones were studied as previously described.^{8–11} The genetic relationship between CPE was evaluated by repetitive polymerase chain reaction (DiversiLab; bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Isolates with identical strain patterns were considered indistinguishable if the similarity percentage was $\geq 95\%$. Multilocus sequence typing analysis was also performed using the Pasteur Institute's multilocus sequence typing scheme (publicly available at www.pasteur.fr/mlst).

RESULTS

Five patients were infected ($n = 3$, 60%) or colonized ($n = 2$, 40%) by carbapenem-resistant *K pneumoniae*. All cases occurred in the ICU in 2 adjacent rooms, rooms 27 and 28. The time course of the outbreak and the characteristics of the patients are described in Table S1. The first case occurred in June 2012. A CPE strain was isolated in a rectal specimen of a man hospitalized 3 months earlier in Casablanca University Hospital for myocardial infarction during a holiday in Morocco. The patient died 3 days after the admission. Three rectal samples of patients (obtained in 3 different weeks) hospitalized in the same period in the ICU were negative. The other 4 cases occurred in the same unit >1 year later: July 2013 ($n = 1$), November 2013 ($n = 1$), and February 2014 ($n = 2$). No patient had a history of recent travel abroad or was hospitalized in a hospital where the endemic OXA-48–producing *K pneumoniae* found in the South of France area was previously described. Three developed septicemia as a result of infection or colonization at other sites (urinary tract, lung, or arterial catheter). These 3 patients were hospitalized in the same room (room 27), and all died. The last case (patient 5), who stayed in room 28, was only colonized and survived.

After the fifth case, environmental investigation was initiated. On February 15, 2014, carbapenem-resistant *K pneumoniae* were detected in 2 of 15 environmental locations of room 27: sink drains and mattress. Over 4 days, sink drains were cleaned using 150 mL of bleach (2.6% sodium hypochlorite) twice per day. Cleaning and disinfection of fomites and surfaces were strengthened (quaternary ammonium compounds and 0.5% sodium hypochlorite). On February 21, a second environmental study of 5 rooms, including rooms 27 and 28, was performed, with negative results. On February 27, after the death of patient 4, the mattress of room 27 was removed and replaced. Sinks were changed, and all disposable supplies were discarded and replaced. On March 3, before the

reopening of the room, a last environmental screening was conducted at the 15 locations and at all medical devices, leading to negative results. After the last episode, rectal swabs were performed at admission and weekly for all patients admitted to the ICU. No other case has been detected.

Microbiologic investigations showed that the 5 clinical and 2 environmental strains were all OXA-48–producing *K pneumoniae* (Table S2). They also expressed *bla*CTX-M-15, *oqxAB*, *aac(6')*Ib-cr, and *ant(2'')* genes. One strain expressed *qnrB* gene (ARS 497). Repetitive polymerase chain reaction showed that all strains isolated from room 27 belonged to the same clone and to ST15. The strain (ARS 497) isolated in room 28 was nonclonal even if it also belonged to ST15 (Fig 1). No strain was related to the endemic OXA-48–producing *K pneumoniae* found in the South of France area.

DISCUSSION

This study reports, for the first time to our knowledge, the persistence of OXA-48–producing *K pneumoniae* in the same hospital room over 20 months. The hospital environment and particularly the inanimate surfaces were often considered as the reservoir of outbreak of multidrug-resistant bacteria and health care–associated infections.¹² Humid conditions, high inoculum, and low temperatures improve persistence of bacteria.¹³ Gram-negative bacteria were described to persist longer than Gram-positive bacteria. Indeed, many Gram-negative species can survive on inanimate surfaces even for several months. These species are found among the most frequent isolates from patients with health care–associated infection.¹³

The importance of our study is the evidence that CPE can survive over several months. *K pneumoniae* is now a well-known recipient of carbapenemase genes, and a worldwide propagation of this species was described.² The persistence of this XDR species must strengthen disinfection requirements of a room (and the direct inanimate environment of contaminated patients) where a carrier patient has been hospitalized. Disinfection and change of mattress is of particular importance. The multidisciplinary management, implication and the reactivity of the teams involved, and rapid detection of CPE limited the number of cases in our structure.

CONCLUSION

In a context where the evolution of antibiotic resistance is moving faster than the synthesis of new antimicrobials,

focused interventions to reduce cross transmission of XDR *Enterobacteriaceae* are therefore required; these must absolutely include environmental monitoring.

Acknowledgments

We thank the hygienist nurses and the intensive care unit staff for their assistance and cooperation. Mariella Lomma provided assistance in preparing and editing the manuscript.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2015.09.021>.

References

1. Djahmi N, Donyach-Remy C, Pantel A, Dekhil M, Sotto A, Lavigne JP. Epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii* in Mediterranean countries. *Biomed Res Int* 2014;2014:305784.
2. Dortet L, Cuzon G, Nordmann P. Dissemination of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in France, 2012. *J Antimicrob Chemother* 2014;69:623–7.
3. Pantel A, Boutet-Dubois A, Jean-Pierre H, Marchandin H, Sotto A, Lavigne JP. French regional surveillance program of carbapenemase-producing gram-negative bacilli: results from a 2-year period. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014;33:2285–92.
4. Weber DJ, Rutala WA, Miller MB, Huslage K, Sickbert-Bennett E. Role of hospital surfaces in the transmission of emerging health care-associated pathogens: norovirus, *Clostridium difficile*, and *Acinetobacter* species. *Am J Infect Control* 2010;38(Suppl):S25–33.
5. Tofteland S, Naseer U, Lislevand JH, Sundsfjord A, Samuelsen O. A long-term low-frequency hospital outbreak of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* involving intergenus plasmid diffusion and a persisting environmental reservoir. *PLoS One* 2013;8:e59015.
6. Naas T, Cuzon G, Bogaerts P, Glupczynski Y, Nordmann P. Evaluation of a DNA microarray (Check-MDR CT102) for rapid detection of TEM, SHV, and CTX-M extended-spectrum β -lactamases and of KPC, OXA-48, VIM, IMP, and NDM-1 carbapenemases. *J Clin Microbiol* 2011;49:1608–13.
7. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;70:119–23.
8. Kim HB, Wang M, Park CH, Kim EC, Jacoby GA, Hooper DC. *oqxAB* encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents Chemother* 2009;53:3582–4.
9. Lindemann PC, Risberg K, Wiker HG, Mylvaganam H. Aminoglycoside resistance in clinical *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Western Norway. *APMIS* 2012;120:495–502.
10. Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Arakawa Y. Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. *Antimicrobial Agents Chemother* 2008;52:1564–6.
11. Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, Soussy CJ, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J Antimicrob Chemother* 2007;60:394–7.
12. Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis* 2006;6:130.
13. Lemmen SW, Hafner H, Zolldann D, Stanzel S, Lutticken R. Distribution of multi-resistant Gram-negative versus Gram-positive bacteria in the hospital inanimate environment. *J Hosp Infect* 2004;56:191–7.

Publication n°10

Pantel A, Souzy D, Sotto A, Lavigne JP. Evaluation of two phenotypic screening tests for carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*.

J Clin Microbiol. 2015 Oct;53(10):3359-62.

Evaluation of Two Phenotypic Screening Tests for Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*

Alix Pantel,^{a,b} Dimitri Souzy,^b Albert Sotto,^{a,c} Jean-Philippe Lavigne^{a,b}

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université de Montpellier, UFR de Médecine, Nîmes, France^a; Laboratoire de Bactériologie, CHU Carémieu, Nîmes University Hospital, Nîmes, France^b; Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, CHU Carémieu, Nîmes University Hospital, Nîmes, France^c

We evaluated the performance of two rapid tests for detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) strains. The sensitivities and the specificities were 97.6% and 94.4% for the Rapid CARB Screen and 98.8% and 93.1% for the KPC/MBL & OXA-48 Confirm tests, providing the usefulness of these tools for screening CPE in microbiology wards.

The global dissemination of extremely drug-resistant (XDR) Gram-negative bacilli with acquired carbapenemase genes is a major public health concern (1, 2). Vigilant surveillance and rapid and reliable identification of these strains by personnel in the clinical microbiology laboratory are essential to effective infection control (screening of patients who come from a foreign country and were hospitalized in this country in the previous year, screening of contact patients, etc.) (3, 4). Mass spectrometry and molecular typing are used to detect enzymatic resistance to carbapenems and eliminate impermeability mechanisms (5). However, these techniques require specific equipment and substantial expertise and, thus, cannot be implemented in all laboratories. Moreover, PCR-based techniques have the limitation of not detecting new enzymes (6). Recently, new phenotype-based methods have become more accessible. They have been described for the identification of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) and include the modified Hodge test (MHT) (7), biochemical tests detecting carbapenemase hydrolytic activity (8), carbapenemase inhibitor-based tests (9, 10), and high-level temocillin resistance for OXA-48-like carbapenemase, for which no specific inhibitor is available (11). This work aimed to evaluate two screening methods recently commercialized for the detection of CPE in clinical microbiology laboratories: the Rapid CARB Screen (RCS) kit and the KPC/MBL & OXA-48 Confirm (KMOC) kit (Rosco Diagnostica A/S, Taastrup, Denmark).

A panel of 155 clinical and ATCC strains of various enterobacterial species belonging to a collection of our regional multidrug-resistant Gram-negative Bacilli Reference Lab was tested (12–14) (Table 1). Eighty-three strains harboring known carbapenemase-encoding genes were included in this panel. All these isolates were typed by the Check-MDR CT102 microarray (Check-Points, Netherlands), and the presence of carbapenemase genes was confirmed by specific PCR and sequence analysis (15). Seventy-two carbapenemase-negative isolates were also included: 61 carbapenem resistant due to overexpression of chromosomal AmpC or expression of plasmid-mediated AmpC and/or extended-spectrum beta-lactamases coupled to impermeability and 11 carbapenem susceptible. In all isolates, plasmid-mediated AmpC were identified by multiplex PCR (16).

Carbapenem MICs were determined by Etest (bioMérieux, Marcy l'Etoile), and the results were interpreted using the Société Française de Microbiologie (SFM)/EUCAST guidelines (<http://www.sfm-microbiologie.org>). The RCS and KMOC tests were performed on strains grown on Mueller-Hinton agar plates fol-

lowing the manufacturer's recommendations. The RCS is a commercially available rapid chromogenic test for the detection of carbapenemases and is based on the hydrolysis of imipenem in the presence of an indicator (phenol red) (Fig. 1). All the components of the kit are present within tablets called diatabs. To perform the assay, the diatabs are dissolved in saline medium according to the manufacturer's instructions. The lysate of each sample is added to a well with a dissolved diatab with imipenem and to a well with a dissolved diatab without imipenem. A standardized bacterial inoculum of 5 McFarland must be used from an overnight culture strain recovered from Mueller-Hinton agar plates. Fifty microliters of this suspension was resuspended in 100 μ l of Tris-HCl lysis buffer (B-PER II bacterial protein extraction reagent; Thermo-Fisher), vortexed for 1 min, and incubated at room temperature for 30 min. Any color change from red to yellow or orange after 30 min to 2 h was interpreted as a positive reaction (Fig. 1). For the KMOC test, a bacterial suspension was prepared from an overnight bacterial culture. The inoculum was adjusted to 0.5 McFarland from single colonies in saline medium and plated on Mueller-Hinton agar plates (bioMérieux). The five tested Rosco disks (meropenem 10 μ g [MRP10], meropenem 10 μ g plus phenyl boronic acid [MRPBO], meropenem 10 μ g plus dipicolinic acid [MRPDP], meropenem 10 μ g plus cloxacillin [MRPCX], and temocillin 30 μ g) were deposited on these plates at equal distances. Results were interpreted by three independent readers. Sensitivity and specificity were determined for each test.

Results obtained with the RCS and KMOC tests for CPE and carbapenemase-negative *Enterobacteriaceae* collection strains are detailed in Table 1.

The sensitivity and specificity of the RCS test compared to

Received 5 May 2015 Returned for modification 21 June 2015

Accepted 23 July 2015

Accepted manuscript posted online 29 July 2015

Citation Pantel A, Souzy D, Sotto A, Lavigne J-P. 2015. Evaluation of two phenotypic screening tests for carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol 53:3359–3362. doi:10.1128/JCM.01211-15.

Editor: P. Bourbeau

Address correspondence to Jean-Philippe Lavigne, jean.philippe.lavigne@chu-nimes.fr.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved. doi:10.1128/JCM.01211-15

TABLE 1 Characteristics of studied isolates and performance of the Rapid CARB Screen (RCS) and the KPC/MBL & OXA-48 Confirm (KMOC) tests for the detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*

Group	β -Lactamase designation	Species	No. of strains	ESBL, Plasmidic AmpC (no. of strains)	MIC range, (mg/liter) ^a				No. (%) of positive results	
					ERT	IMP	MER	DOR	RCS test	KMOC test
Class A carbapenemase producers	KPC type	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	CTX-M-group 1 (4) CTX-M-group 2 (1) (0)	8->32	0.5->32	1.5->32	1->32	12 (100)	12 (100)
		<i>Escherichia coli</i>	1	(0)	3	0.75	0.5	0.38		
		<i>Citrobacter freundii</i>	1	(0)	1	1	1	1		
Class B carbapenemase producers	NDM type	<i>K. pneumoniae</i>	7	CTX-M-group 1 (6) CMY (1)	3-24	0.75-4	1-6	0.5-6	16 (88.9)	17 (94.4)
		<i>E. coli</i>	5	CTX-M-group 1 (3) DHA (1)	1-6	1-2	0.75-2	0.5-0.75		
		<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	CTX-M-group 1 (1)	6	1	1.5	2		
	VIM type	<i>Proteus mirabilis</i>	1	DHA (1)	0.38	1	0.75	0.5		
		<i>Salmonella enterica</i>	1	CTX-M-group 1 (1)	6	3	3	1		
		<i>DHA (1)^b</i>								
	OXA-48 type	<i>K. pneumoniae</i>	1	(0)	2	1	1	0.5		
		<i>E. coli</i>	1	CMY (1)	2	1.5	1	0.5		
		<i>C. freundii</i>	1	(0)	0.125	2	0.38	0.38		
			36	CTX-M-group 1 (34)	0.75->32	0.25->32	0.38->32	0.19->32	52 (100)	52 (100)
Class D carbapenemase producers	OXA-48 type	<i>E. coli</i>	10	CTX-M-group 1 (1)	0.5-12	0.38-12	0.032-12	0.032-8		
		<i>Enterobacter cloacae</i>	3	CTX-M-group 9 (1)	0.75-8	0.5-1	0.38-1.5	0.19-0.75		
		<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	CTX-M-group 1 (1)	1.5	0.5-0.75	0.38	0.25-0.5		
	OXA-48 type + NDM type	<i>C. freundii</i>	1	(0)	12	3	2	2		
		<i>K. pneumoniae</i>	1	CTX-M-group 1 (1)	>32	1.5	2.5	2	1 (100)	1 (100)
	Carbapenem resistant	<i>K. pneumoniae</i>	11	CTX-M-group 1 (5) DHA (2)	0.75->32	0.25-6	0.064-6	0.047-3	4 (5.6)	5 (6.9)
		<i>E. coli</i>	11	CTX-M-group 1 (6) CTX-M-group 9 (2)	1->32	0.38-4	0.125-6	0.032-4		
Noncarbapenemase producers	Carbapenem susceptible	<i>E. cloacae</i>	10	CMY (1) CTX-M-group 1 (4) CTX-M-group 9 (1)	1.5->32	0.25->32	0.125-4	0.125-4		
		<i>E. aerogenes</i>	10	SHV-5 (2)	0.75->32	0.38->32	0.094-4	0.064-6		
		<i>C. freundii</i>	8	TEM-24 (2)	0.75->32	0.25-8	0.064-4	0.047-1.5		
	Carbapenem susceptible	<i>K. oxytoca</i>	5	CTX-M-group 9 (1)	0.75->32	0.19->32	0.125->32	0.094->32		
		<i>Morganella morganii</i>	3	TEM-3 (1)	0.75->32	3-4	0.094-0.125	0.064-0.19		
		<i>Citrobacter koseri</i>	2	(0)	0.023-0.094	0.25	0.38	0.125-0.19		
		<i>Hafnia alvei</i>	1	(0)	1-2	1	0.19	0.125		
	Carbapenem susceptible	<i>K. pneumoniae</i>	5	CTX-M-group 1 (3) DHA (3) ^b	0.125-0.5	0.125-0.38	0.032-0.25	0.032-0.125		
		<i>E. cloacae</i>	3	CTX-M-group 1 (1)	0.38-0.5	0.19-0.38	0.047-0.25	0.047-0.125		
		<i>E. coli</i>	1	CTX-M-group 1 (1)	0.19	0.125	0.016	0.012		
	Carbapenem susceptible	<i>C. freundii</i>	1	(0)	0.5	0.19	0.064	0.047		
		<i>P. mirabilis</i>	1	CMY	0.5	0.19	0.032	0.032		

^a ERT, ertapenem; IMP, imipenem; MER, meropenem; DOR, doripenem.^b One isolate expressed both CTX-M-group 1 and DHA enzymes.

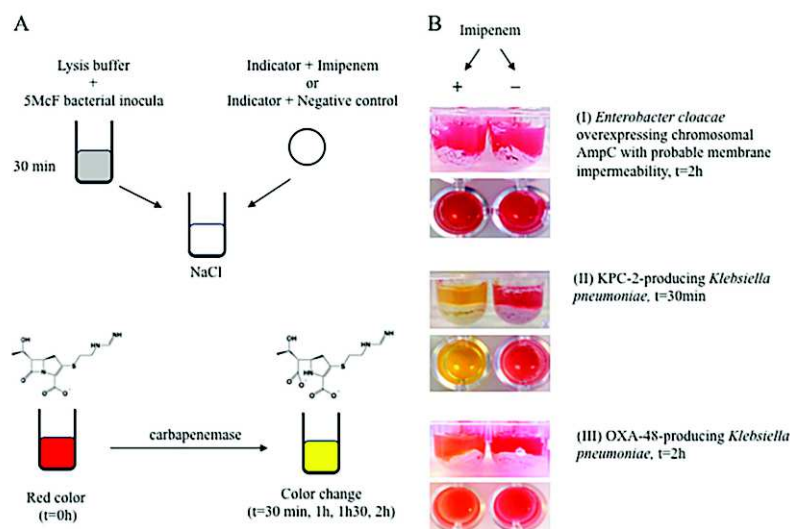


FIG 1 Description of the Rapid CARB Screen (RCS) test (A) and representative results (B) with a noncarbapenemase producer (I) and with two carbapenemase producers (II, III) using 5 McFarland (5 McF) bacterial inocula. The imipenem pellet was inserted into the left well, and the negative control was inserted into the right one.

those of the molecular techniques were 97.6% and 94.4%, respectively. As previously described (17), it was observed that assay performance depended on the carbapenemase enzyme produced. The RCS test detected all class A and D carbapenemase producers (Table 1), including 5 OXA-48 producers with low imipenem MICs (0.25 to 0.38 mg/liter). Concerning class B carbapenemase producers, 16/18 metallo- β -lactamase (MBL) strains tested were positive. One NDM-producing *Escherichia coli* and one VIM-producing *E. coli* were not detected (imipenem MICs of 1 mg/liter for the two isolates). Four carbapenemase nonproducers were positive by the RCS test; of these, three were *Morganella morganii* isolates with natural impermeability to imipenem and one was a *Citrobacter freundii* isolate susceptible to carbapenems with AmpC overexpression.

The sensitivity and specificity for CPE detection using the KMOC test were 98.8% and 93.1%, respectively. As for the biochemical test, this assay identified all class A and D carbapenemase producers. It failed to detect one NDM-producing *Proteus mirabilis* isolate (difference of 4 mm on the combined disc [meropenem plus dipicolinic acid] instead of 5 mm). Five carbapenemase-nonproducing strains appeared false positive; one KPC false positive was a *C. freundii* isolate with AmpC overexpression, one MBL false positive was a CTX-M-15-producing *E. coli* isolate, and three OXA-48 false-positive isolates were *Citrobacter koseri*, *Hafnia alvei*, and *Klebsiella oxytoca* strains.

The present work evaluated two phenotypic tests for their ability to accurately identify CPE at a low cost (€3 and €4 less per assay performed for KMOC and RCS, respectively). The two assays are easy to implement (less than 30 min of preparation) and allow the detection of all enzyme classes. The RCS failed to identify two MBLs even if we tested a high inoculum (5 McFarland). As prerequisite to maximize the sensitivity of detection, it is essential to increase the concentration of the inoculum tested. Moreover, any color change compared to the control well (without imipenem) should be considered positive. A difference of result between enzyme classes has been observed (17); KPC producers turned the

bacterial suspension rapidly, whereas for OXA-48 and NDM producers with relatively low carbapenem MICs, color change took longer. In our study the two undetected MBL strains have low MICs to carbapenem (1 mg/liter), demonstrating the limitation of this test to detect these isolates even with an increased inoculum. Another main difficulty of this test is related to residues of tablet that dissolve poorly in the reaction medium and can hinder the interpretation where the color change is low as previously noted (17). However, this test remains very effective and allows a quick response (between 1 h and 2.5 h). The KMOC test provides a reliable phenotypic detection method for CPE, but results are obtained only after 18 h of culture. This method gives information on the enzyme class and may guide further testing by a molecular approach. Furthermore, its interpretation is easy and not subjective, and the coexpression of several carbapenemases can be detected. As previously reported, the sensitivity of synergy tests for *Proteus* spp. is low because of swarming (18); in our study, the only unidentified CPE is indeed an NDM-producing *P. mirabilis* isolate for which the synergy with dipicolinic acid was present but not sufficient. The specificity of OXA-48 producers found in our study was slightly less powerful than the study of van Dijk et al. (98.1% versus 100%, respectively) (18).

In conclusion, the RCS and KMOC tests provide an accurate and easy to perform detection of CPE with reasonable costs. In developing countries where CPE are less prevalent than carbapenem resistance due to impermeability, the two tests can be used regardless of the epidemiology and are particularly appropriate in screening when molecular tools are unavailable or too expensive (12).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by INSERM.

We thank Eurobio for providing us with the two screening tests. We thank Mariella Lomma for her editing assistance.

We declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Glasner C, Albiger B, Buist G, Tambić Andrašević A, Canton R, Carmeli Y, Friedrich AW, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, Livermore DM, Nordmann P, Poirel L, Rossolini GM, Seifert H, Vatopoulos A, Walsh T, Woodford N, Donker T, Monnet DL, Grundmann H, the European Survey on Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE) working group. 2013. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: a survey among national experts from 39 countries, February 2013. *Euro Surveill* 18:pil=20525. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20525>.
- Nordmann P, Naas T, Poirel L. 2011. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* 17:1791–1798. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1710.110655>.
- Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AK, Wertheim HF, Sumpradit N, Vlieghe E, Hara GL, Gould IM, Goossens H, Greko C, So AD, Bigdeli M, Tomson G, Woodhouse W, Ombaka E, Peralta AQ, Qamar FN, Mir F, Kariuki S, Bhutta ZA, Coates A, Bergstrom R, Wright GD, Brown ED, Cars O. 2013. Antibiotic resistance—the need for global solutions. *Lancet Infect Dis* 13:1057–1098. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70318-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70318-9).
- Fournier S, Monteil C, Lepointeur M, Richard C, Brun-Buisson C, Jarlier V, AP-HP Outbreaks Control Group. 2014. Long-term control of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* at the scale of a large French multihospital institution: a nine-year experience, France, 2004 to 2012. *Euro Surveill* 19:pil=20802. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20802>.
- Lasserre C, De Saint Martin L, Cuzon G, Bogaerts P, Lamar E, Glupczynski Y, Naas T, Tandé D. 2015. Efficient detection of carbapenemase activity in *Enterobacteriaceae* by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry in less than 30 minutes. *J Clin Microbiol* 53:2163–2171. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.03467-14>.
- Nordmann P, Poirel L. 2013. Strategies for identification of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* 68:487–489. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks426>.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 25th informational supplement. CLSI M100-S25. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Nordmann P, Poirel L, Dortet L. 2012. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* 18:1503–1507. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1809.120355>.
- Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, Pitout JD. 2012. Laboratory detection of *Enterobacteriaceae* that produce carbapenemases. *J Clin Microbiol* 50:3877–3880. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02117-12>.
- Birgy A, Bidet P, Genel N, Doit C, Decré D, Arlet G, Bingen E. 2012. Phenotypic screening of carbapenemases and associated β -lactamases in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 50:1295–1302. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.06131-11>.
- Hartl R, Widhalm S, Kerschner H, Apfalter P. 2013. Temocillin and meropenem to discriminate resistance mechanisms leading to decreased carbapenem susceptibility with focus on OXA-48 in *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect* 19:E230–E232. <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12146>.
- Pantel A, Boutet-Dubois A, Jean-Pierre H, Marchandin H, Sotto A, Lavigne JP. 2014. French regional surveillance program of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli: results from a 2-year period. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 33:2285–2292. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-014-2189-5>.
- Robert J, Pantel A, Mérens A, Lavigne JP, Nicolas-Chanoine MH. 2014. Incidence rates of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* clinical isolates in France: a prospective nationwide study in 2011–12. *J Antimicrob Chemother* 69:2706–2712. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dku208>.
- Lavigne JP, Cuzon G, Combescure C, Bourg G, Sotto A, Nordmann P. 2013. Virulence of *Klebsiella pneumoniae* isolates harboring *bla*_{KPC-2} carbapenemase gene in a *Caenorhabditis elegans* model. *PLoS One* 8:e67847. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0067847>.
- Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. 2011. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 70:119–123. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002>.
- Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. 2002. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 40:2153–2162. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.40.6.2153-2162.2002>.
- Simner PJ, Gilmour MW, DeGagne P, Nichol K, Karlowsky JA. 2015. Evaluation of five chromogenic agar media and the Rosco Rapid Carb Screen kit for detection and confirmation of carbapenemase production in gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* 53:105–112. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02068-14>.
- van Dijk K, Voets GM, Scharringa J, Voskuil S, Fluit AC, Rottier WC, Leverstein-Van Hall MA, Cohen Stuart JW. 2014. A disc diffusion assay for detection of class A, B and OXA-48 carbapenemases in *Enterobacteriaceae* using phenyl boronic acid, dipicolinic acid and temocillin. *Clin Microbiol Infect* 20:345–349. <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12322>.

2 Etude des modulations de la perméabilité membranaire et de l'efflux chez *E. coli* ST131, impact sur le fitness et la virulence

Parallèlement à ces différentes études sur la résistance aux antibiotiques des entérobactéries, nous nous sommes intéressés plus particulièrement au clone responsable de la majorité des infections à *E. coli* MDR (12), le clone ST131. Ce clone pandémique a été décrit comme le clone prédominant de la flore intestinale des sujets sains, parmi les *E. coli* de phylotype B2 (224). Au sein des ST131, un sous-clone majeur, H30-Rx, a rapidement diffusé. Ce sous-clone se distingue par l'expression de l'allèle 30 de *fimH*, la production de la BLSE CTX-M-15 et la résistance aux fluoroquinolones par des mutations spécifiques de *gyrA* et *parC* (13).

En plus des mécanismes d'hydrolyse enzymatique et de modification de cibles, la variation de l'influx et de l'efflux membranaires est un paramètre-clé de la résistance bactérienne aux antibiotiques (14, 15). Chez les entérobactéries, les systèmes d'efflux de type RND jouent un rôle prépondérant dans la multirésistance. La surexpression de la pompe AcrAB-TolC entraîne chez les entérobactéries une résistance croisée aux β -lactamines (notamment les molécules les plus lipophiles), aux quinolones, aux cyclines et au chloramphénicol (14, 443). L'imperméabilité membranaire par défaut d'expression des porines est également associée à une diminution de sensibilité des β -lactamines. Les molécules les plus touchées sont les carbapénèmes, c'est-à-dire le traitement de choix des infections sévères à bacilles à Gram négatifs multirésistants (5), et les céphamycines, une possible alternative dans le traitement des infections causées par les EBLSE (16, 17).

Si l'impact de la modulation de la perméabilité membranaire sur la virulence a été étudiée chez *K. pneumoniae*, *E. aerogenes* ou *S. enterica* (18–20), peu d'études se sont intéressées à cet impact chez *E. coli*, et aucune chez le clone pandémique ST131. L'objectif de travail était de *i*) comprendre les mécanismes régulant la perméabilité membranaire de *E. coli* ST131, *ii*) évaluer leur impact sur le fitness de *E. coli* (mobilité, capacité à former du biofilm) et *iii*) déterminer le potentiel de virulence de mutants d'imperméabilité, d'efflux, ou associant les deux mécanismes, *in vivo* chez le nématode *C. elegans*.

Publication n°11

Pantel A, Pagès JM, Dunyach-Remy C, Ngba C, Mesureur J, Sotto A, Nicolas Chanoine MH, Lavigne JP. Modulation of membrane influx and efflux in *Escherichia coli* ST131 has an impact on bacterial motility, biofilm formation and virulence in a *Caenorhabditis elegans* model.

Ce travail sera soumis dans Antimicrobial Agents and Chemotherapy.

Modulation of membrane influx and efflux in *Escherichia coli* ST131 has an impact on bacterial motility, biofilm formation and virulence in a *Caenorhabditis elegans* model

Alix Pantel^{1,2}, Catherine Dunyach-Remy¹, Christelle Ngba¹, Jennifer Mesureur¹, Albert Sotto^{1,3}, Jean-Marie Pagès⁴, Marie-Hélène Nicolas Chanoine^{5,6,7}, Jean-Philippe Lavigne^{1,2*}

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1047, Université de Montpellier, UFR de Médecine, Nîmes, France

²Service de Microbiologie, CHU Carémeau, Nîmes, France

³Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, CHU Carémeau, Nîmes, France

⁴Transporteurs Membranaires, Chimiorésistance et Drug Design, Facultés de Médecine et Pharmacie, UMR-MD1, IRBA – Université Aix-Marseille, Marseille, France

⁵Service de Microbiologie, Hôpital Beaujon, AP-HP, Clichy, France

⁶Faculté de Médecine, Université Paris Diderot - Paris 7, Paris, France

⁷INSERM, UMR 1149, Université Paris Diderot - Paris 7, Paris, France.

Running Head: ST131 *Escherichia coli* and membrane permeability

*Corresponding author: Pr Jean-Philippe Lavigne, Service de Microbiologie, CHU Caremeau, Place du Professeur Robert Debre, 30029 Nîmes Cedex 09 – E-mail: jean.philippe.lavigne@chu-nimes.fr

ABSTRACT

Energy-dependent efflux overexpression and altered outer membrane permeability (influx) can promote multidrug resistance (MDR). The present study clarified the regulatory pathways that control membrane permeability in the pandemic clone *E. coli* ST131 and evaluated the impact of efflux and influx modulations on biofilm formation, motility and virulence in the *Caenorhabditis elegans* model. Mutants of two uropathogenic (UPEC) strains, MECB5 (ST131, *H30-Rx*, and CFT073 (ST73) as well as a faecal strain, S250 (ST131, *H22*), were *in vitro* selected using continuous subculture in sub-inhibitory concentration of ertapenem (ETP), chloramphenicol (CMP) and ceftiofur (FOX). Mutations in genes known to control permeability were objectified for the two UPEC strains: MECB5-FOX (deletion of 127 base pairs (bp) in *marR*, deletion of 1 bp and insertion of *IS1* element in *acrR*) and CFT073-CMP (1bp deletion causing a premature stop in *marR*). We also demonstrated that efflux phenotypes in the mutants selected by CMP and FOX, were related to the AcrAB-TolC pump but also to other efflux systems of different families. Alteration of membrane permeability, *e. g.* underexpression of the two major porins, OmpF and OmpC, was shown in MECB5-ETP and mutants selected by FOX. Lastly, our finding suggested that efflux pump-overproducing isolates (CMP-mutants) posed a serious threat in terms of virulence (significant reduction in worms median survival) and host colonization (significant increase in swimming motility and biofilm formation capacities). Lack of porins (ETP and FOX-mutants) led to a high level of antibiotic resistance in *H30-Rx* subclone. Nevertheless, this adaptation created a physiological disadvantage (decreased motility and ability to form biofilm) associated with a low potential of virulence.

Keywords: *Escherichia coli*, ST131, MultiDrug Resistance, Efflux, Permeability, biofilm, motility.

INTRODUCTION

Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) is the leading causative agent of urinary tract infection (UTI) in both community and hospital worldwide (1). The therapeutic management of UTI is increasingly problematic because of the widespread resistance to all classes of antibiotics, even in community-acquired infections (2). With the dissemination of the novel CTX-M family, *E. coli* has become the species most frequently associated with the production of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) (3). In 2008, a globally disseminated and multidrug resistant (MDR) clone of *E. coli* O25b:H4-ST131 was identified in clinical samples from three continents (4). Since this first description, ST131 was shown to be a successful clone causing the most MDR *E. coli* infections while exhibiting multiple virulence factors (5, 6). Moreover, it was described as one of the most prevalent clone among phylogenetic group B2 in the digestive carriage of healthy subjects in France (7). Within the ST131 group, various subclonal lineages have been identified. Actually, a dominant subclone named H30-Rx has expanded extensively. This subgroup harbours the allele 30 of *fimH*, the type 1 fimbrial adhesin gene, and is associated with both *bla*_{CTX-M-15} carriage and fluoroquinolones resistance by specific topoisomerases mutations (8).

Besides enzymatic hydrolysis or target modification, energy-dependent efflux and altered outer membrane permeability can promote resistance to antimicrobial agents. In *Enterobacteriaceae*, overexpression of the chromosomally encoded AcrAB-TolC efflux pump plays a major role in MDR, leading to a cross-resistance phenotype affecting Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) of quinolones, β -lactams (mainly ceftiofur), chloramphenicol and cyclines (9). A permeability defect as a result of porin loss or changes in porin structure is involved in β -lactams resistance (10). The two principally affected classes are carbapenems, regarded as the most powerful agents for the treatment of serious infections caused by ESBL-producers (11), and cephamycins, a potential alternative to carbapenems for treating ESBL-producing *E. coli* isolates (12). In *E. coli*, the major outer membrane proteins (OMP) allowing the permeation of hydrophilic compounds are OmpC and OmpF (13). Among various genetic regulators, systemic transcriptional activators of the AraC/XylS family, MarA and its homologs SoxS and Rob, control the expression level of both efflux systems and porins (14, 15). In addition, expression of the *acrAB* genes is modulated by the local repressor AcrR (16), and the balance of porins is regulated by the two-component system EnvZ-OmpR (17).

If impact of efflux and influx modulation on virulence has been demonstrated in *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica* and *Enterobacter aerogenes* (18-21), few studies have investigated this impact in *E. coli*, and none in the pandemic clone ST131. This raises the question of the cost of the successive accumulation of membrane-associated resistance mechanisms for the bacterial fitness during the antibiotic chemotherapy and its consequence on the bacterial capacity during colonization process. Taking into account the role of OMP in various physiological states, the balance of membrane permeability can play a key role in the adaptation of *E. coli* to host conditions. The aim of this work was to get more insight into the regulatory pathways that control membrane permeability in ST131 *E. coli* and evaluate the impact of efflux and influx modulation on biofilm formation, motility and virulence in the *Caenorhabditis elegans* model.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains

Experiments were carried out using three strains belonging to phylogenetic group B2: (i) the UPEC MECB5 strain, which is a representative isolate of the ST131 H30-Rx subclone and virotype C, isolated from urine of patient with cystitis in South of France (4, 22, 23), (ii) the UPEC CFT073 reference strain, isolated from blood and belonging to the ST73 (23, 24) and (iii) strain S250, which is a recent (2006) representative of the ST131 H22 subclone and virotype D obtained from the digestive tract of a French healthy individual (7, 23, 25, 26). The main characteristics and virulence traits of these isolates are presented in Table 1. The avirulent OP50 *E. coli* was used as food source and control for the nematodes assays (18, 23).

In vitro selection of mutants

Three antibiotics were used for their behaviour associated with the membrane permeability: (i) ertapenem (ETP), known to select mutants with porins alteration (18, 27), (ii) chloramphenicol (CMP) that selects mutants with efflux pump overexpression (9, 19), and (iii) cefoxitin (FOX), whose resistance has been described with the two mechanisms (28, 29). Mutants of each strain were selected using the procedure described by Miller *et al.* (30) by

continuous subculture in Mueller Hinton (MH) broth containing subinhibitory concentrations (sub-MICs, 0.25 x MICs) of ETP, CMP or FOX. Such growth conditions were repeated for 150 days. The decrease in antibiotic susceptibility was tested weekly.

Clonality analysis

Parental strains and mutants selected by antibiotic pressure were compared by repetitive sequence-based PCR (rep-PCR) analysis (DiversiLab[®] system, bioMérieux, Marcy l'étoile, France). Strains with a similarity percentage ≥ 95 % were considered clonal.

Antibiotic susceptibility tests

The susceptibility of the mutants to antibiotics was determined by the agar diffusion method according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and the French Antibigram committee (CA-SFM) guidelines (<http://www.sfm-microbiologie.org>). For mutants selected by FOX, MH agar containing cloxacillin at 250 mg/L (bioMérieux) was used to check the absence of chromosomal AmpC overproduction.

MICs of a panel of antibiotics including β -lactams (amoxicillin (AMX), FOX, cefotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ), ETP and imipenem (IMP)), quinolones (nalidixic acid (NAL), ofloxacin (OFX)), CMP, tetracycline (TET) and tigecycline (TGC) were determined by the broth microdilution method. Tests were carried out in triplicate with or without fixed concentration (25 μ g/mL) of phenylalanine arginine β -naphthylamide (PA β N) (Sigma Chemical Co.), a broad-spectrum efflux pump inhibitor. An efflux pump activity was suspected when the PA β N addition induced a threefold decrease in MIC value (31).

Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and immunocharacterization of outer membrane proteins

Exponential-phase bacteria in Luria–Bertani (LB) broth were pelleted and solubilised as previously described (32). Samples (bacterial amount corresponding to 0.02 optical density units at 600 nm) were loaded onto SDS-PAGE gels (10% polyacrylamide, 0.1% SDS). After electrophoresis, proteins were then electrotransferred to nitrocellulose membranes (Schleicher & Schuell, Keene, NH) in transfer buffer (20 mM Tris, 150 mM glycine, 20% isopropanol, 0.05% sodium dodecyl sulfate). An initial blocking step was performed

overnight at 4°C with Tris-buffered sodium (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl; pH 8) containing skimmed milk powder (10%). The nitrocellulose membranes were then incubated in Tris-buffered sodium containing skimmed milk powder (10%) and Triton X-100 (0.2%) for 2 h at room temperature in the presence of polyclonal antibodies directed against the denatured components of the AcrAB-TolC pump or against the denatured OmpC or OmpF porins. The detection of antigen-antibody complexes was performed with alkaline phosphatase-conjugated AffinitiPure goat anti-rabbit IgG antibodies (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) (32).

DNA sequencing of the MDR regulators gene

The presence of mutations in the MDR regulators *marR*, *acrR* and *soxRS* genes was assessed by PCR and sequencing (33, 34). The sequences and the annealing temperature (T_m) of the primers used are presented in Table S1.

Comparative real-time RT-PCR

For selected genes involved in MDR regulation, efflux and permeability (Table S1), transcript levels were performed by qRT-PCR. Briefly, MECB5, S250, CFT073 and their respective isogenic mutants selected by ETP, CMP or FOX were grown in MH broth to an OD_{600} of ~ 0.7 . Total RNA from bacterial samples was extracted by using the RNeasy Mini kit as described by the manufacturer (Qiagen, Courtaboeuf, France). RNA was treated with the RNase-Free DNase Set (Qiagen). Purity and concentration were determined using the NanoDropTM 2000 spectrophotometer (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA). cDNA was synthesized from 1 μ g of total RNA for each sample, using the iScriptTM Select cDNA Synthesis Kit (Biorad, Hurcules, CA) with random primers according to the manufacturer's instructions. Real-time PCR assays were performed in a LightCycler[®]480 device using the LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} SYBRGreen I kit with 100 ng of cDNA and 10 pmol of target primers (Table S1). The specificity of the PCR products was tested by melting point analysis. Amplifications were performed in duplicate from 3 different RNA preparations. The $2^{-\Delta\Delta CT}$ method was used to analyse transcriptional changes in target genes using *gapA* as the housekeeping control gene (35, 36). Data were log-transformed to obtain a fold change difference between strains.

Nematode killing assay

The *C. elegans* infection assays analysed survival rates in the presence of the different UPEC strain and their isogenic mutants. Fer-15 mutant worms, which have a temperature sensitive fertility defect, were maintained and infected as previously described (18, 23). A nematode was considered dead when it no longer responded to touch. *E. coli* virulence was assessed using the nematode survival curve and calculating the LT50 corresponding to the median time (in days) required to kill 50% of the *C. elegans* population. At least three replicates experiments, repeated three times, were performed for each strain.

Motility assays

The motility of the 3 parental UPEC and their mutants was evaluated using soft agar LB plates as described previously: swim plates containing 0.25% agar and swarm plates containing 0.5% agar supplemented with 0.5% glucose (37). Briefly, bacteria grown overnight in LB were diluted 1000-fold in LB and incubated at 37°C to an OD₆₀₀ of ~ 0.7. Swarm plates were inoculated into the middle of soft agar by spotting with 5 µl of standardized culture. Swimming plates were seeded with the same inoculum below the agar surface using a sterile inoculating needle. Plates were incubated for 16 h at 37°C. The diameters of the migration zones produced by the parental and mutant strains were compared. Swimming and swarming experiments were performed independently 3 times.

Kinetics of biofilm formation

The kinetics of early biofilm was explored using the BioFilm Ring Test[®] (BioFilm Control, Saint Beauzire, France) as described (38). Briefly, standardized bacterial cultures were incubated at 37°C in 96 well micro-titer plate in the presence of magnetic beads. After different time points, plates were placed onto a magnetic block test and put in the reader. The images of each well before and after magnetic attraction were analysed with the BioFilm Control software that gives a BioFilm Indice (BFI). A high BFI value (> 7) corresponds to a high mobility of beads under magnet action (no biofilm) while a low value (< 2) corresponds to a full immobilization of beads due to the sessile cells. Three experiments with two repeats were performed per strain and per incubation time.

Statistical analysis

Statistics and graphs were prepared using the software package (GraphPad Prism 6.0). The effects of antibiotic selection pressure on expression of selected genes and motility were assessed using one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test. Log-transformed data were used for real time RT-PCR. Kinetics of biofilm formation were compared with a two-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test. For the nematode killing assays, differences in survival rates between parental strain and isogenic mutant were tested by a log-rank (Mantel-cox) test for statistical significance. $P < 0.05$ was considered to reflect a statistically significant difference.

Nucleotide sequence accession numbers

Novel sequences of MDR regulators determined in this study have been deposited to GenBank. Their corresponding accession numbers are presented in Figure 1.

RESULTS

Selection of resistant mutants

Continuous subculture of MECB5, S250 and CFT073 with sub-MICs of ETP, CMP and FOX had successfully selected isogenic mutants resistant to these antibiotics, except for ETP resistance that was only obtained with the CTX-M-15-producing MECB5. No variation of ETP MICs was observed over weeks for strains S250 and CFT073 and experiments were stopped after 150 days of subcultures. Rep-PCR assessed clonal relationship between parental strains and mutants (similarity $> 98\%$, data not shown). The number of days required to obtain mutants are presented in Table 2.

Antibiotic susceptibility pattern

The MICs of different antibiotics are detailed in Table 2.

Parental strains. As described above, MECB5 belonged to ST131 *H30-Rx* subclone that produced CTX-M-15 ESBL responsible for resistance to aminopenicillins and extended-spectrum cephalosporins (ESC) and carried a distinctive *gyrA* and *parC* combination

(S83L/D87N GyrA and S80I/E84V ParC double substitutions) (22) responsible for quinolone resistance. S250 and CFT073 parental strains were fully susceptible to all antibiotics tested.

ETP-mutant (Table 2). ETP- mutant was only obtained from strain MECB5 (MECB5-ETP). It was resistant to ETP (MIC 2 µg/mL) but remained susceptible to IMP (0.5 µg/mL), according to the revised EUCAST criteria. This mutant was associated with a significant increase in FOX MIC (4 times higher). Levels of susceptibility to quinolones, CMP and cyclines were similar to those of the parental strain.

CMP-mutants (Table 2). For the CMP-mutants obtained from the three strains, CMP resistance (32-64 µg/mL) was associated with significant higher MICs of NAL and OFX (2 to 8 times), TET (2 to 4 times) and TGC (2 to 4 times). Adding PAβN in the medium emphasized the efflux resistance mechanism, leading to a decrease in the MICs of CMP (8-16 fold), quinolones (4-32 fold) and cyclines (2-4 fold).

FOX-mutants. In the FOX-mutants obtained from the three parental strains, an increase in MICs was observed for FOX (8 to 32 times), NAL and OFX (2 to 8 times), CMP (2 to 4 times) and, to a lesser extent, TGC (2 times). For MECB5-FOX mutant, FOX resistance was associated with ETP resistance (1 µg/mL). Antibiotic activity was partially restored by efflux pump inhibitor, except for ETP for which PAβN addition had no effect on MIC. FOX resistance was not attributable to AmpC overproduction since FOX activity was not restored on MH agar containing cloxacillin (data not shown).

Outer membrane proteins profile

As indicated in Table 3, all the mutants selected with CMP and FOX displayed higher AcrA and AcrB signals than those of the parental strains. Outer membrane proteins (OMP) OmpC and OmpF were detected at the same expression level for CMP-mutants. In contrast, no porin was detected in strains MECB5-ETP, MECB5-FOX and S250-FOX. This lack of porin was observed with antisera that recognized OmpC and OmpF. Interestingly, CFT073-FOX presented a similar OmpC and OmpF production than the parental strain (Table 4).

Sequences of regulator genes

Alterations in MDR regulators contribute to MDR phenotype, by modulating both efflux and membrane permeability. To gain insight into the contribution of this pathway, genes encoding local (*acrR*) and global (*marR*, *soxR*) repressors were amplified and sequenced.

Firstly, sequences of *acrR*, *marR* and *soxR* of MECB5, S250 and CFT073 were compared with those of *E. coli* strain K-12 substrain MG1655, available in the GenBank database (accession number NC_000913.3). For the three studied strains, *acrR* sequences were identical or showed only silent polymorphisms. However, *marR* and *soxR* sequences showed two and one non-synonymous substitutions, respectively, for the three strains (Figure 1).

Secondly, sequences obtained for the *in vitro*-selected mutants were compared to those of their parental strains. The mutant MECB5-FOX displayed *acrR* and *marR* sequences different from those of MECB5 (Figure 1). *acrR* showed two alterations. The first is a deletion of one base pair (bp) occurring quickly at +34 nucleotide position. This results in a shift in the reading frame throughout the gene. Moreover, a 776-bp insertion occurred at the end of *acrR*, 546-bp upstream from the ATG start codon. This insertion corresponded to the integration of the insertion sequence *IS1* accompanied by a duplication of 8-bp in the target DNA at the site of insertion, and flanked by 18-bp left and right inverted repeats at its end (accession number KT984280). *marR* of MECB5-FOX was disrupted by a 127-bp deletion at position 161 to 288 upstream the GTG start codon, resulting in an early frameshift and termination (stop codon at +168, accession number KT984283). Concerning the CFT073-CMP mutant, the *marR* gene showed a thymine deletion at the +50 nucleotide location, causing immediately a premature stop codon (accession number KT984284). The other strains (MECB5-ETP, MECB5-CMP, S250-ETP, S250-CMP, S250-FOX, CFT073-ETP, CFT073-FOX) harboured *acrR* and *marR* sequences identical to those of parental strains. No mutation was found throughout the *soxR* gene of any mutants, except that already hosted by the parental strains.

Comparative real-time RT-PCR

To understand behaviour changes under antibiotic pressure, the expression levels of the different genes involved in MDR were measured for the isogenic mutants and compared to those of their parental strains. Their log relative transcription levels are shown in Figure 2 for strain MECB5 and in Figures S1, S2 for S250 and CFT073.

Genes responding to stress

– ***marRAB* operon and *micF*.** *marA* gene, which encodes for a transcriptional activator targeting many genes involved in resistance to stress (14), is significantly overexpressed in mutants MECB5-ETP ($p < 0.05$), MECB5-CMP and MECB5-FOX ($p < 0.001$) with respect to their parental strains (Figure 2A). *marA* is also significantly upregulated in mutants S250-CMP ($p < 0.01$) and CFT073-CMP and FOX ($p < 0.001$) (Figures S1A, S2A). Similar upregulations were assessed with *marB*, which encodes for a periplasmic protein that modulates *marA* expression (39) and the non-coding RNA stress response *micF* (40) ($p < 0.01 - 0.001$). MarR is an autorepressor of the operon *marRAB*. Comparative RT-PCR showed a significant decrease in *marR* expression in MECB5-FOX ($p < 0.001$), consistent with sequencing results (the primer *marR_R* used targets a region deleted into the gene). In contrast, disrupted *marR* of mutant CFT073-CMP (stop codon at +51) was overexpressed ($p < 0.001$) (Figure S2A).

– ***soxS*, *rob* and *sdiA* genes.** Expression of *soxS* and *rob*, two other positive transcriptional regulators belonging to the AraC/XylS family (15), appeared less impacted than *marA* (Figure 2A). *rob* was only upregulated in strain S250-CMP ($p < 0.05$) (Figure S1A). The expression of *sdiA*, encoding a quorum-sensing transcription factor (41), was significantly increased in the ST131 mutants whatever the antibiotic pressure ($p < 0.05 - p < 0.001$) and in CFT073-FOX ($p < 0.01$).

Genes encoding efflux pump systems

– ***acrAB* genes.** The expression of genes encoding the major Resistance-Nodulation-Division (RND) efflux pump in *Enterobacteriaceae* was principally increased in mutants harbouring MDR regulators alterations, MECB5-FOX and CFT073-CMP ($p < 0.05 - p < 0.001$) (Figures 2B, S2B).

– **other RND transporter genes.** Expressions of *acrD*, encoding RND transporter able to expel highly hydrophilic molecules like aminoglycosides, *acrE* and *acrF*, encoding close homologs of AcrA and AcrB, and *yhiV* (*mdtF*) were significantly upregulated in the 3 mutants selected by CMP ($p < 0.05 - p < 0.001$). *acrEF* and *yhiV* were also overexpressed in MECB5 and CFT073 mutants selected by FOX ($p < 0.05 - p < 0.001$).

– **Major Facilitator Superfamily (MFS) and Small Multidrug Resistance (SMR) transporters genes.** The increase in the MdfA activity was very significant among all CMP-mutants ($p < 0.01 - p < 0.001$) and, to a lesser extent, MECB5-FOX and S250-FOX ($p < 0.05$). The increased level of activity of *tehA* and *emrB* genes was much less evident: *tehA*

was significantly upregulated for S250-CMP and CFT073-CMP mutants while *emrB* showed a highest level of activity only for the mutant S250-CMP.

Genes encoding proteins involved in OM permeability.

- ***envZ*, *ompR* and *ompX* regulator genes.** The expression of *envZ*, which encodes an osmoregulatory sensor protein (17), was upregulated for MECB5-FOX ($p < 0.001$) and the 3 CMP-mutants ($p < 0.05$) (Figures 2C, S1C and S2C). The expression level of *ompR*, which encodes the cytosolic response regulator, followed this trend. *ompX*, encoding another porin expression down-regulator (42), was overexpressed for MECB5-ETP mutant ($p < 0.05$) and strains S250 and CFT073 selected by CMP and FOX ($p < 0.05$ – $p < 0.001$).
- ***ompC*, *ompF* and *ompA* porin genes.** Upregulation of *ompX* observed for MECB5-ETP was associated with a significant decrease in both *ompC* and *ompF* expression ($p < 0.05$ – $p < 0.001$). For S250-ETP and CFT073-ETP, which remained susceptible to ETP, no modification of *ompC* and *ompF* expressions could be noted. A significant decrease in *ompF* expression without modification of that of *ompC* was assessed for both mutants selected by FOX and for S250-CMP and CFT073-CMP ($p < 0.05$ – $p < 0.001$). These data were consistent in MECB5-FOX, S250-CMP, CFT073-CMP and CFT073-FOX with the increased expression level of *ompR* and *envZ* encoding for the two-component system that allows the *ompC* transcription and *ompF* repression (43). Unlike *ompC* and *ompF*, transcription of *ompA*, which encodes an architectural protein, was conserved after antibiotic pressure whatsoever.
- **Protease genes.** An increased expression of genes that encode for proteases DegP and DegS responsible for post-translational control of OMP expression (44) were noted for MECB5 and CFT073 mutants selected by FOX ($p < 0.05$). The expression of other proteases ClpP and RseP remained identical for all strains.

Strains virulence

The *C. elegans* model was used to explore the possible relationship between *in vitro* acquisition of resistance to ETP, CMP or FOX and modifications of virulence behaviour.

Foremost, the life span of *C. elegans* feeding on parental strains was compared to that obtained when non-pathogenic *E. coli* OP50 was used as food (Table 4). LT50, *i.e.* median survival in days, was significantly reduced when worms fed on MECB5, S250 and CFT073 (LT50: 5 ± 0.5 , 5 ± 0.5 and 4 ± 0.5 , respectively) in comparison with OP50 (LT50: 7 ± 0.5) indicating that the three studied strains are virulent for nematodes ($p < 0.0001$ for both

strains). The ST131 strains showed similar virulence profile (p non-significant (NS)). However, CFT073 was significantly more virulent than MECB5 and S250 ($p < 0.05$). As shown in Table 4, CMP pressure selected more virulent strains ($p < 0.01$), except in the case of CFT073-CMP that killed worms as fast as the parental strain (p NS). Inversely, nematodes died more slowly when fed on FOX-mutants and MECB5-ETP ($p < 0.001$).

Motility assays

To determine if the changes in virulence were linked to a motility variation, bacterial swimming and swarming motilities were quantified on soft agar. As shown in Figures 3 and 4, all CMP-mutants showed a significant increase in swimming area ($p < 0.05 - p < 0.001$). In contrast, the swimming behaviour was considerably affected for the 3 mutants selected by FOX ($p < 0.05 - p < 0.001$). ETP pressure did not seem to influence swimming motility (p NS). Swarming behaviour was not significantly different between parental and mutants strains.

Kinetics of biofilm formation

The BioFilm Ring Test[®] was performed to examine the effect of antibiotic pressure on the capacity of *E. coli* to form biofilm and understand the virulence changes observed in worms. Results revealed different profiles among parental strains and among their mutants (Figure 5).

– **MECB5 strains.** For MECB5 parental strain, the biofilm was in formation after 7 h of incubation (BFI value = 4.63 ± 0.20) but longer incubation (until 24 h) failed to completely immobilized beads (Figure 5A). The same trend could be noted for MECB5-CMP mutant the first hours, but then, the number of sessile bacteria were significantly increased after 15 h (BFI = 5.47 ± 0.45 , $p < 0.0001$) and 22h (BFI = 3.40 ± 0.36 , $p < 0.0001$). In contrast, no biofilm formation was detected for MECB5-ETP and MECB5-FOX mutants after 24 h showing a significant difference between these strains and the parental one ($p < 0.0001$).

– **S250 strains.** The kinetic of biofilm formation for S250 strain was very fast, with a biofilm constituted after 2 h (BFI = 2.56 ± 0.09) (Figure 5B). Antibiotic pressure had no significant impact on this kinetic of formation: BFI values for each mutant were similar to those of parental strain.

– **CFT073 strains.** For CFT073 strain (Figure 5C), biofilm formation was obtained after 4 h ($\text{BFI} = 1.9 \pm 0.06$). CFT073-CMP mutant showed a significantly faster formation than parental strain, with beads immobilized at 2.5 h ($\text{BFI} = 1.90 \pm 0.06$) ($p < 0.0001$). As observed for MECB5 strain, growth with sub-MICs of ETP or FOX altered the capacity of CFT073 to form biofilm. Biofilm formation was significantly delayed for CFT073-FOX at 2.5, 3 and 3.5 h ($p < 0.0001$). For CFT073-ETP, the difference was only significant at 2.5 h of incubation ($p < 0.0001$).

DISCUSSION

Since early 2000, the expansion of *E. coli* ST131, and more especially the H30-Rx subclone, has led to a worldwide increase in ESBL-producing and FQ-resistant *E. coli* isolates in both community and hospital settings (45). The present study describes a link between the antibiotic pressure and the adaptive strategy used by bacteria involving the modulation of influx/efflux balance in the inner and outer membrane. Consequently, this modification of membrane permeability observed in our mutants might have some side effect on the virulence capacity and the fitness of *E. coli*.

Continued growth in the presence of non-lethal antibiotic levels is a crucial aspect of the current antibiotic resistance crisis. Sub-MICs of antibiotics are present in many natural environments (46). They also occur in patients during therapy and are likely to accelerate the evolution of resistance by triggering some regulations of protein expression, by increasing mutagenesis in targeted genes and/or by favouring recombination. We evaluated the behaviour of two representative strains of *E. coli* ST131, MECB5 (H30-Rx) and S250 (H22), and the CFT073 UPEC reference strain grown under antimicrobial pressure with antibiotics known to interact with the membrane influx and/or efflux: ETP, CMP and FOX (17, 24-26, 44). Mutants resistant to these antibiotics were obtained for all strains with the exception of ESC susceptible strains S250 and CFT073 for which no increase in ETP MICs was noted after 5 months of subculture. These results were in agreement with those of Tängdén and Girlich, which also observed that carbapenems resistance in *E. coli* was only selected among ESBL-producing strains (27, 48).

Concerning the MECB5-ETP mutant, the western blot analysis indicated that the resistance to ETP is associated with a lack in the expression of the major OmpC and OmpF porins. Interestingly qRT-PCR showed that the loss of transcription was particularly important for

ompC, as previously observed by Girlich *et al.* (27), and was rather related to overexpression of *ompX* than that of the *envZ-ompR* control system. This role of OmpX in the porin expression (at transcriptional and translational regulation level) has been previously reported during short exposure to chemicals (42).

In the CMP mutants, the important efflux activity was confirmed by overexpression of the main pump AcrAB-TolC, leading to higher MICs of CMP, FOX, quinolones and cyclines. Interestingly, genes encoding other efflux systems less frequently described in clinical resistance (36) were highly overexpressed: *acrEF*, *mdfA*, *yhiV* and, to a lesser extent, *acrD* and *tehA*, suggesting that the increase in *E. coli* efflux is a global phenomenon that involves several pumps of different families.

Finally, FOX-pressure resulted in an increasing efflux and a reduced influx. The efflux activity significantly increased in the MECB5-FOX strain for which the repressor AcrR was no longer functional. This mutant was obtained fairly quickly (70 days of subcultures) and this raises the question of the use of cephamycins in the treatment of infections with ESBL producers (12). Inactivating mutations in *acrR* gene were previously reported in MDR clinical isolates of *E. coli*, *S. enterica*, *E. aerogenes* and *K. pneumoniae* (49-53). To our knowledge, this is the first description of a frameshift deletion associated with an *IS1* insertion in *acrR* gene. *acrR::IS1* has been described only once in a *E. coli* veterinary strain (DE28) (54). In this isolate, insertion occurred earlier in the sequence of *acrR*, at nucleotide +394 (+546 in our study) (accession number JN652619.1). Moreover, for the three FOX-mutants, a lack of OmpF expression could be noted while that of OmpC was less affected, or even increased in the case of CFT073-FOX. Such differences of expressions can be explained by the increased activity of MicF, a small antisense RNA affecting *ompF* expression at a post-transcriptional level (40), and the activation of the two-component system EnvZ-OmpR. After phosphorylation by EnvZ, OmpR promotes expression of *ompC*, which encodes a porin that exhibits narrower channels compare to OmpF porin (17).

The most important modulation of influx/efflux regulation in the bacterial membrane was observed for MECB5-FOX and CFT073-CMP. These two mutants harbored alterations in the global MDR regulator *marR*, highlighting the key-role of the activator MarA in *E. coli*, which is devoid of the activator RamA. The other AraC/XylS activators, SoxS and Rob, for which genes expression varied only slightly in selected mutants, appeared less involved in the regulation of the MDR. In contrast, overexpression of *sdiA* was observed in all ST131-

mutants studied. SdiA is homologous to the LuxR family of quorum-sensing transcription factors which has been previously described as involved in *acrAB*, *acrD* and *acrEF* overexpression in ESC or quinolones resistant isolates (41, 55, 56). In this study, SdiA appeared to be involved in the adaptive resistance of the ST131 clone, whatever the antibiotic pressure. Nevertheless, its intrinsic role was difficult to assess due to the concomitant upregulation of *marA* in most ST131-mutants.

A link between the modulation of influx/efflux balance at the membrane level and the virulence has been previously described in different enterobacteria (18-21, 57). In *E. coli*, lack of porins was associated with low invasion and virulence profile (58, 59) while ABC-type pump MacAB-TolC seemed to increase the pathogenicity of enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) by the secretion of enterotoxine II (60). Some publications have demonstrated the useful and interest of *C. elegans* nematode to study *E. coli* virulence (23, 61). The present study highlights, in this model, the direct impact of a strong modification in the membrane organization and physiology on the bacterial virulence. Indeed, the lack of both OmpC and OmpF in the ST131 H30-Rx strain selected by ETP was associated with a reduced virulence. This finding suggested that the alteration of outer membrane porins might be a serious disadvantage/deal for the bacterial fitness, compared to the β -lactamase production (21, 23). On the other hand, the overexpression of efflux systems was correlated with an increased virulence of the ST131-mutants selected by CMP. These bacterial efflux systems export toxic compounds, such as antibiotics, as well as important virulence factors for the colonization of human and animal cells (adhesins, toxins, iron capture system) (9). The expression of AcrAB-TolC has been described as a pre-requisite step in the early bacterial colonization step, for instance to pass the bile salt barrier or host defensin activity (19, 20). Unchanged virulence potential observed for the CFT073-CMP derivate can be explained by the decreased expression of *ompF*, following *micF* overexpression in this strain harboring a prematurely-interrupted *marR* gene. Another possible explanation is that the *C. elegans* model has some limitations when highly virulent strains, as CFT073, are under consideration. As described in *K. pneumoniae* (18), increased efflux systems did not appear to offset the lack of porins in the FOX-mutants which showed attenuated virulence.

To understand whether a modification of the fitness could contribute to the difference in virulence phenotypes observed, we examined the motility of mutants and their capacity to form biofilm. CMP-pressure greatly improved swimming motility for all mutants. FOX-

pressure led to an opposite effect. These different behaviours could contribute to the virulence variations observed in *C. elegans*, as motility has been reported to enhance the bacterial spreading during infection (62).

The biofilm production is an important pathogenicity factor as it can protect the bacteria from immune system and antimicrobial drugs (63). Very different behaviours were observed among the two ST131 parental isolates. The *H22*-strain formed early biofilm very quickly in 2 h. This property was stable whatever the antibiotic pressure for this colonizing strain of the digestive tract. At the opposite, *H30-Rx*-strain was not able to form a full early biofilm in 24 h, showing that the ability to form biofilm is not the key factor that accounts for the success of this subclone. These results are consistent with Olesen and Shin, which showed among ST131 strains that biofilm production was strongly associated with non-*H30* subclones and non-CTX-M isolates, respectively (64, 65). Previous study had shown that sub-MICs of antibiotic (aminoglycosides, tetracycline and fluoroquinolones) triggered biofilm formation (66). In our study, CMP pressure induced this effect (speeding up biofilm formation in CFT073-CMP, increase in the number of sessile bacteria in ST131 MECB5-CMP). Nevertheless, kinetics was found to be slowed down in ETP or FOX derivatives, emphasizing even the lower colonization capacity for the porins deficient strains. Interestingly, ETP sub-MIC influenced also the behaviour of CFT073 that remained susceptible to this antibiotic, slowing down the biofilm formation. The delay in biofilm formation observed in FOX-mutants could be explained by the decreased swimming motility, which is an essential parameter in biofilm organization (67).

In conclusion, the modification of outer membrane permeability, *e.g.* lack of porins observed in the ST131 *E. coli* mutants, leads to a high level of resistance to all β -lactams in isolates belonging to the ST131 subclone *H30-Rx* and producing CTX-M-15. Nevertheless, this adaptation creates a physiological disadvantage regarding the involvement of porins in nutrient uptake that are requested for the bacterial life and growth. FOX and ETP pressure promote the selection of isolates exhibiting alterations of membrane permeability and consequently induce an important cost for the bacterial fitness involving a low potential of virulence. Conversely, our finding suggests that efflux pump overproducing isolates pose a serious threat in terms of host colonization and virulence, compared to membrane-altered isolates that exhibit a restricted capability to survive in stress conditions.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by INSERM. We thank Mariella Lomma for her editing assistance.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflict of interest to declare.

REFERENCES

1. **Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ.** 2015. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol* **13**:269–284.
2. **Chen YH, Ko WC, Hsueh PR.** 2013. Emerging resistance problems and future perspectives in pharmacotherapy for complicated urinary tract infections. *Expert Opin Pharmacother* **14**:587–96.
3. **Cantón R, Coque TM.** 2006. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* **9**:466–475.
4. **Nicolas-Chanoine MH, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso MP, Caniça MM, Park YJ, Lavigne JP, Pitout J, Johnson JR.** 2008. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother* **61**:273–281.
5. **Johnson JR, Johnston B, Clabots C, Kuskowski MA, Castanheira M.** 2010. *Escherichia coli* sequence type ST131 as the major cause of serious multidrug-resistant *E. coli* infections in the United States. *Clin Infect Dis* **51**:286–294.
6. **Brisse S, Diancourt L, Laouénan C, Vigan M, Caro V, Arlet G, Drieux L, Leflon-Guibout V, Mentré F, Jarlier V, Nicolas-Chanoine MH.** 2012. Phylogenetic distribution of CTX-M- and non-extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates: group B2 isolates, except clone ST131, rarely produce CTX-M enzymes. *J Clin Microbiol* **50**:2974–81.
7. **Leflon-Guibout V, Blanco J, Amaqdouf K, Mora A, Guize L, Nicolas-Chanoine MH.** 2008. Absence of CTX-M enzymes but high prevalence of clones, including clone ST131, among fecal *Escherichia coli* isolates from healthy subjects living in the area of Paris, France. *J Clin Microbiol* **46**:3900–3905.
8. **Banerjee R, Johnson JR.** 2014. A new clone sweeps clean: The enigmatic emergence of *Escherichia coli* sequence type 131. *Antimicrob Agents Chemother* **58**:4997–5004.
9. **Li XZ, Plésiat P, Nikaido H.** 2015. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev* **28**:337–418.
10. **Page JM, James CE, Winterhalter M.** 2008. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* **6**:893–903.
11. **Vardakas KZ, Tansarli GS, Rafailidis PI, Falagas ME.** 2012. Carbapenems versus alternative antibiotics for the treatment of bacteraemia due to *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β -lactamases: A systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* **67**:2793–2803.
12. **Kernéis S, Valade S, Geri G, Compain F, Lavollay M, Rostane H, Carbonnelle E, Mainardi JL.** 2015. Cefoxitin as a carbapenem-sparing antibiotic for infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Dis (Lond)* **47**:793–9.
13. **Cowan SW, Schirmer T, Rummel G, Steiert M, Ghosh R, Paupit RA, Jansonius JN, Rosenbusch JP.** 1992. Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature* **358**:727–733.

14. **Alekshun MN, Levy SB.** 1997. Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: The *mar* regulon. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:2067–2075.
15. **Martin RG, Gillette WK, Rhee S, Rosner JL.** 1999. Structural requirements for marbox function in transcriptional activation of *mar/sox/rob* regulon promoters in *Escherichia coli*: Sequence, orientation and spatial relationship to the core promoter. *Mol Microbiol* **34**:431–441.
16. **Ma D, Alberti M, Lynch C, Nikaido H, Hearst JE.** 1996. The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of *acrAB* genes of *Escherichia coli* by global stress signals. *Mol Microbiol* **19**:101–112.
17. **Mizuno T, Mizushima S.** 1990. Signal transduction and gene regulation through the phosphorylation of two regulatory components: the molecular basis for the osmotic regulation of the porin genes. *Mol Microbiol* **4**:1077–1082.
18. **Bialek S, Lavigne JP, Chevalier J, Marcon E, Leflon-Guibout V, Davin A, Moreau R, Pagès JM, Nicolas-Chanoine MH.** 2010. Membrane efflux and influx modulate both multidrug resistance and virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a *Caenorhabditis elegans* model. *Antimicrob Agents Chemother* **54**:4373–4378.
19. **Padilla E, Llobet E, Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Bengoechea JA, Albertí S.** 2010. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob Agents Chemother* **54**:177–183.
20. **Buckley AM, Webber MA, Cooles S, Randall LP, La Razione RM, Woodward MJ, Piddock LJ V.** 2006. The AcrAB-TolC efflux system of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium plays a role in pathogenesis. *Cell Microbiol* **8**:847–856.
21. **Lavigne JP, Sotto A, Nicolas-Chanoine MH, Bouziges N, Bourg G, Davin-Regli A, Pagès JM.** 2012. Membrane permeability, a pivotal function involved in antibiotic resistance and virulence in *Enterobacter aerogenes* clinical isolates. *Clin Microbiol Infect* **18**:539–545.
22. **Lavigne JP, Marchandin H, Delmas J, Moreau J, Bouziges N, Lecaillon E, Cavalie L, Jean-Pierre H, Bonnet R, Sotto A.** 2007. CTX-M β -lactamase-producing *Escherichia coli* in French hospitals: Prevalence, molecular epidemiology, and risk factors. *J Clin Microbiol* **45**:620–626.
23. **Lavigne JP, Vergunst AC, Goret L, Sotto A, Combescure C, Blanco J, O’Callaghan D, Nicolas-Chanoine MH.** 2012. Virulence potential and genomic mapping of the worldwide clone *Escherichia coli* ST131. *PLoS One* **7**:1–10.
24. **Mobley HL, Green DM, Trifillis AL, Johnson DE, Chippendale GR, Lockatell C V, Jones BD, Warren JW.** 1990. Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: Role of hemolysin in some strains. *Infect Immun* **58**:1281–9.
25. **Johnson JR, Tchesnokova V, Johnston B, Clabots C, Roberts PL, Billig M, Riddell K, Rogers P, Qin X, Butler-Wu S, Price LB, Aziz M, Nicolas-Chanoine MH, Debroy C, Robicsek A, Hansen G, Urban C, Platell J, Trott DJ, Zhanel G, Weissman SJ, Cookson BT, Fang FC, Limaye AP, Scholes D, Chattopadhyay S, Hooper DC, Sokurenko EV.** 2013. Abrupt emergence of a single dominant multidrug-resistant strain of *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **207**:919–928.
26. **Blanco J, Mora A, Mamani R, López C, Blanco M, Dahbi G, Herrera A, Marzoa J, Fernández V, De La Cruz F, Martínez-Martínez L, Alonso MP, Nicolas-Chanoine MH, Johnson JR, Johnston B, López-Cerero L, Pascual Á, Rodríguez-**

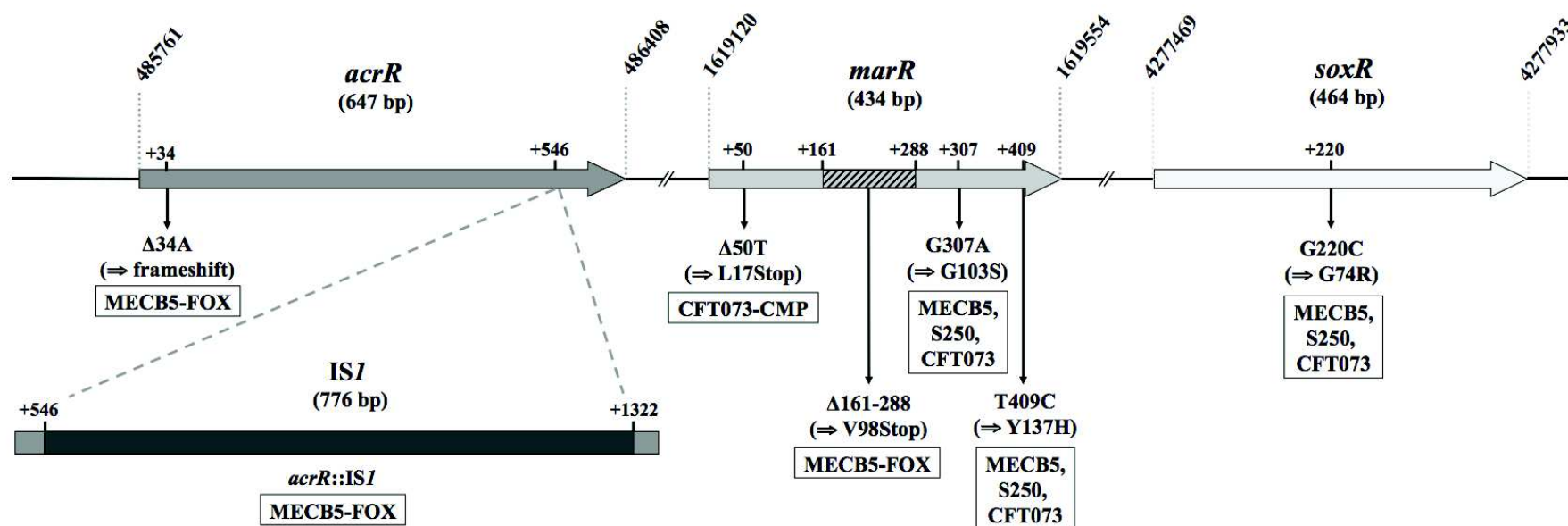
- Baño J.** 2013. Four main virotypes among extended-spectrum- β -lactamase-producing isolates of *Escherichia coli* O25b:H4-B2-ST131: Bacterial, epidemiological, and clinical characteristics. *J Clin Microbiol* **51**:3358–3367.
27. **Girlich D, Poirel L, Nordmann P.** 2009. CTX-M expression and selection of ertapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:832–834.
 28. **Martínez-Martínez L, Hernández-Allés S, Albertí S, Tomás J, Benedi V, Jacoby G.** 1996. In vivo selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* **40**:342–348.
 29. **Bialek-Davenet S, Marcon E, Leflon-Guibout V, Lavigne JP, Bert F, Moreau R, Nicolas-Chanoine MH.** 2011. *In vitro* selection of *ramR* and *soxR* mutants overexpressing efflux systems by fluoroquinolones as well as cefoxitin in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **55**:2795–2802.
 30. **Miller K, O'Neill AJ, Chopra I.** 2002. Response of *Escherichia coli* hypermutators to selection pressure with antimicrobial agents from different classes. *J Antimicrob Chemother* **49**:925–934.
 31. **Malléa M, Chevalier J, Eyraud A, Pagès JM.** 2002. Inhibitors of antibiotic efflux pump in resistant *Enterobacter aerogenes* strains. *Biochem Biophys Res Commun* **293**:1370–1373.
 32. **Mallea M, Chevalier J, Bornet C, Eyraud A, Davin-Regli A, Bollet C, Pagès JM.** 1998. Porin alteration and active efflux: Two *in vivo* drug resistance strategies used by *Enterobacter aerogenes*. *Microbiology* **144**:3003–3009.
 33. **Nicoloff H, Perreten V, Levy SB.** 2007. Increased genome instability in *Escherichia coli lon* mutants: Relation to emergence of multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants caused by insertion sequence elements and large tandem genomic amplifications. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:1293–1303.
 34. **Koutsolioutsou A, Peña-Llopis S, Demple B.** 2005. Constitutive *soxR* mutations contribute to multiple-antibiotic resistance in clinical *Escherichia coli* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:2746–2752.
 35. **Livak KJ, Schmittgen TD.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 $^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* **25**:402–408.
 36. **Viveiros M, Dupont M, Rodrigues L, Couto I, Davin-Regli A, Martins M, Pagès JM, Amaral L.** 2007. Antibiotic stress, genetic response and altered permeability of *E. coli*. *PLoS One* **2**.
 37. **Dusane DH, Hosseinidoust Z, Asadishad B, Tufenkji N.** 2014. Alkaloids modulate motility, biofilm formation and antibiotic susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS One* **9**:e112093.
 38. **Chavant P, Gaillard-Martinie B, Talon R, Hébraud M, Bernardi T.** 2007. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *J Microbiol Methods* **68**:605–612.
 39. **Vinué L, McMurry L, Levy S.** 2013. The 216 bp *marB* gene of the *marRAB* operon in *Escherichia coli* encodes a periplasmic protein which reduces the transcription rate of *marA*. *FEMS Microbiol Lett* **345**:49–55.

40. **Vogel J, Papenfort K.** 2006. Small non-coding RNAs and the bacterial outer membrane. *Curr Opin Microbiol* **9**:605–611.
41. **Rahmati S, Yang S, Davidson AL, Zechiedrich EL.** 2002. Control of the AcrAB multidrug efflux pump by quorum sensing regulator SdiA. *Mol Microbiol* **43**:677–685.
42. **Dupont M, James CE, Chevalier J, Pagès JM.** 2007. An early response to environmental stress involves regulation of OmpX and OmpF, two enterobacterial outer membrane pore-forming proteins. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:3190–3198.
43. **Cai SJ, Inouye M.** 2002. EnvZ-OmpR interaction and osmoregulation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **277**:24155–24161.
44. **Castillo-Keller M, Vuong P, Misra R.** 2006. Novel mechanism of *Escherichia coli* porin regulation. *J Bacteriol* **188**:576–86.
45. **Nicolas-Chanoine MH, Bertrand X, Madec JY.** 2014. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clin Microbiol Rev* **27**:543–574.
46. **Andersson DI, Hughes D.** 2014. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat Rev Microbiol* **12**:465–78.
47. **Poole K.** 2004. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* **10**:12–26.
48. **Tangden T, Adler M, Cars O, Sandegren L, Lowdin E.** 2013. Frequent emergence of porin-deficient subpopulations with reduced carbapenem susceptibility in ESBL-producing *Escherichia coli* during exposure to ertapenem in an *in vitro* pharmacokinetic model. *J Antimicrob Chemother* **68**:1319–1326.
49. **Sato T, Yokota SI, Uchida I, Okubo T, Usui M, Kusumoto M, Akiba M, Fujii N, Tamura Y.** 2013. Fluoroquinolone resistance mechanisms in an *Escherichia coli* isolate, HUE1, without quinolone resistance-determining region mutations. *Front Microbiol* **4**:1–12.
50. **Wang H, Dzink-Fox J, Chen M, Levy SB.** 2001. Genetic characterization of highly fluoroquinolone-resistant clinical *Escherichia coli* strains from China: role of *acrR* mutations. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:1515–1521.
51. **Olliver A, Vallé M, Chaslus-Dancla E, Cloeckert A.** 2004. Role of an *acrR* mutation in multidrug resistance of *in vitro*-selected fluoroquinolone-resistant mutants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *FEMS Microbiol Lett* **238**:267–272.
52. **Pradel E, Pagès JM.** 2002. The AcrAB-TolC efflux pump contributes to multidrug resistance in the nosocomial pathogen *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:2640–2643.
53. **Schneiders T, Amyes SGB, Levy SB.** 2003. Role of AcrR and RamA in fluoroquinolone resistance in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Singapore. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:2831–2837.
54. **Ren Y, Li J, Zhang X, Zeng Z, Zhen P, Zeng D, Liu Y, Jiang H.** 2012. Contribution of insertion within *acrR* to *acrAB* expression and ciprofloxacin resistance in a veterinary *Escherichia coli* isolate. *J Anim Vet Adv* **11**:2436–9.
55. **Wei Y, Lee JM, Smulski DR, Larossa RA.** 2001. Global impact of *sdiA* amplification revealed by comprehensive gene expression profiling of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**:2265–2272.

56. **Tavío MM, Aquili VD, Poveda JB, Antunes NT, Sánchez-Céspedes J, Vila J.** 2010. Quorum-sensing regulator *sdiA* and *marA* overexpression is involved in *in vitro*-selected multidrug resistance of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* **65**:1178–1186.
57. **Tsai YK, Fung CP, Lin JC, Chen JH, Chang FY, Chen TL, Siu LK.** 2011. *Klebsiella pneumoniae* outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 play roles in both antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob Agents Chemother* **55**:1485–1493.
58. **Rolhion N, Carvalho FA, Darfeuille-Michaud A.** 2007. OmpC and the σ E regulatory pathway are involved in adhesion and invasion of the Crohn's disease-associated *Escherichia coli* strain LF82. *Mol Microbiol* **63**:1684–1700.
59. **Turner AK, Terry TD, Sack DA, Londoño-Arcila P, Darsley MJ.** 2001. Construction and characterization of genetically defined *aro omp* mutants of enterotoxigenic *Escherichia coli* and preliminary studies of safety and immunogenicity in humans. *Infect Immun* **69**:4969–4979.
60. **Yamanaka H, Kobayashi H, Takahashi E, Okamoto K.** 2008. MacAB is involved in the secretion of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *J Bacteriol* **190**:7693–7698.
61. **Diard M, Baeriswyl S, Clermont O, Gouriou S, Picard B, Taddei F, Denamur E, Matic I.** 2007. *Caenorhabditis elegans* as a simple model to study phenotypic and genetic virulence determinants of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Microbes Infect* **9**:214–223.
62. **Lane MC, Alteri CJ, Smith SN, Mobley HLT.** 2007. Expression of flagella is coincident with uropathogenic *Escherichia coli* ascension to the upper urinary tract. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:16669–16674.
63. **Hernández-Jiménez E, del Campo R, Toledano V, Vallejo-Cremades MT, Muñoz A, Largo C, Arnalich F, García-Rio F, Cubillos-Zapata C, López-Collazo E.** 2013. Biofilm vs. planktonic bacterial mode of growth: Which do human macrophages prefer? *Biochem Biophys Res Commun* **441**:947–952.
64. **Olesen B, Frimodt-Møller J, Leihof RF, Struve C, Johnston B, Hansen DS, Scheutz F, Krogfelt KA, Kuskowski MA, Clabots C, Johnson JR.** 2014. Temporal trends in antimicrobial resistance and virulence-associated traits within the *Escherichia coli* sequence type 131 clonal group and its H30 and H30-Rx subclones, 1968 to 2012. *Antimicrob Agents Chemother* **58**:6886–95.
65. **Shin J, Ko KS.** 2015. Effect of plasmids harbouring *bla*CTX-M on the virulence and fitness of *Escherichia coli* ST131 isolates. *Int J Antimicrob Agents* **46**:214–218.
66. **Linares JF, Gustafsson I, Baquero F, Martinez JL.** 2006. Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:19484–19489.
67. **Wood TK, González Barrios AF, Herzberg M, Lee J.** 2006. Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* **72**:361–367.

Figure 1. Schematic diagram of the genomic region comprising the *acrR*, *marR* and *soxR* genes in *E. coli* K-12 substrain MG1655 (accession number NC_000913.3).

The nucleotide mutations and the deduced protein changes for the 3 parental strains and their isogenic mutants are clarified. The corresponding accession numbers are indicated.



GenBank accession numbers:

- *acrR*: KT984278 (MECB5), KT984279 (S250), NC_004431.1 (CFT073), KT984280 (MECB5-FOX)
- *marR*: KT984281 (MECB5), KT984282 (S250), NC_004431.1 (CFT073), KT984283 (MECB5-FOX), KT984284 (CFT073-CMP)
- *soxR*: KT984285 (MECB5), KT984286 (S250), NC_004431.1 (CFT073)

Figure 2. Relative mRNA expression level of gene implicated in MDR regulation (A), membrane efflux (B) and permeability (C) for the ST131 *H30-Rx E. coli* MECB5 and its mutants *in vitro*-selected by ertapenem (ETP), chloramphenicol (CMP) and cefoxitin (FOX).

The log-transformed averages of relative fold change of mutants to the parent strain for each antibiotic are presented. The error bars represent the standard deviation from three different RNA preparations. Significant differences from parent MECB5 using Dunnett's test are indicated by * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) and *** ($p < 0.001$).

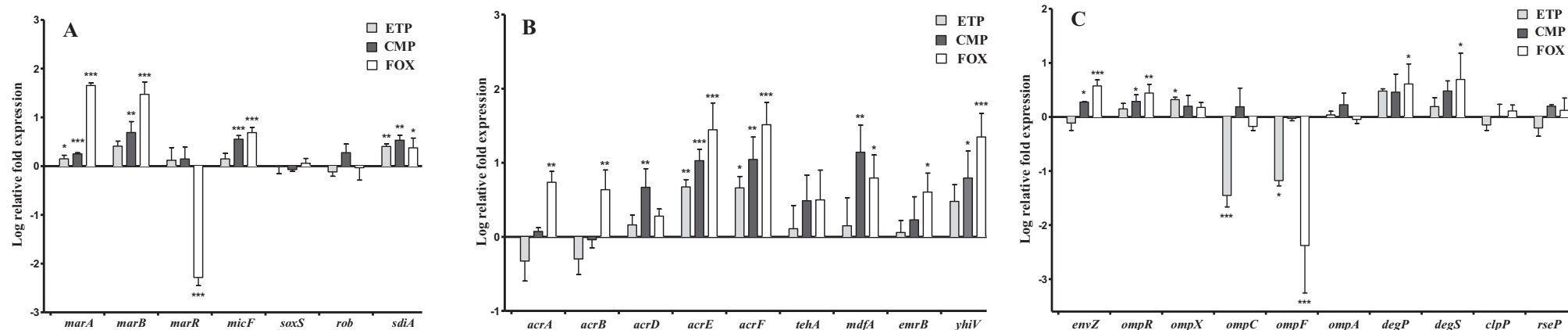


Figure 3. Comparative results of swimming and swarming assays for MECB5, S250 and CFT073 parental strains and isogenic mutants selected by ertapenem (ETP), chloramphenicol (CMP) and ceftiofur (FOX).

The error bars represent the standard deviation from at least 3 different assays. Significant differences from parental strains using Dunnett's test are indicated by * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) and *** ($p < 0.001$).

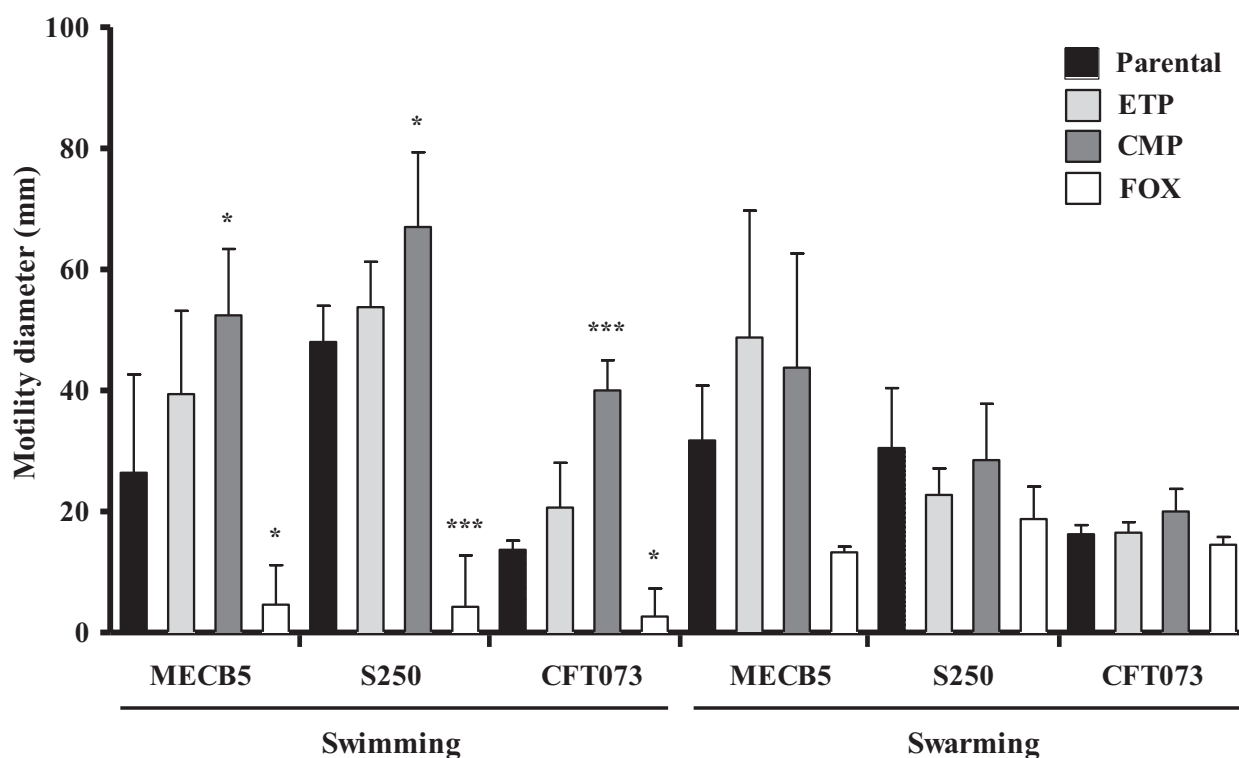


Figure 4. Swimming motility assays conducted on MECB5, S250, CFT073 parental strains and isogenic mutants selected by ertapenem (ETP), chloramphenicol (CMP) and cefoxitin (FOX).

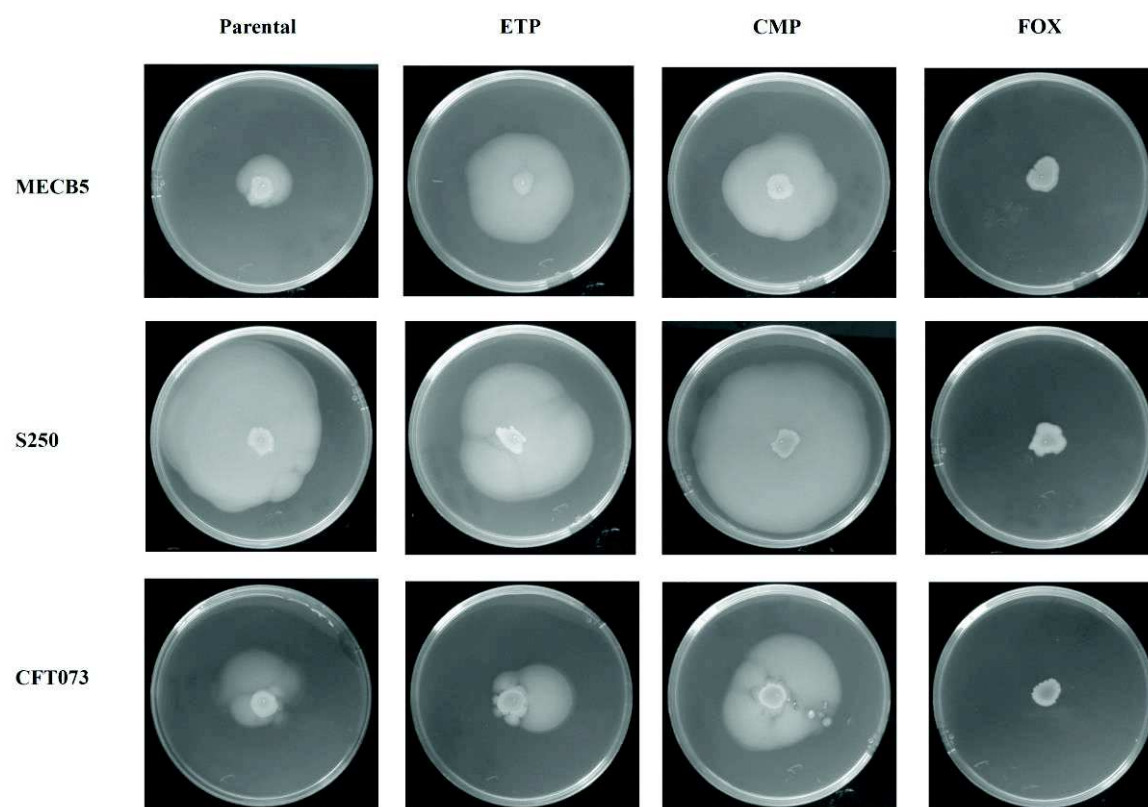


Figure 5. Effect of ertapenem (ETP), chloramphenicol (CMP) and ceftoxitin (FOX) resistance on *E. coli* biofilm formation.

The kinetics of the early phase of biofilm formation for strains MECB5 (A), S250 (B) and CFT073 (C) and their respective mutants were determined by the BioFilm Ring Test[®] (BioFilm Control). Means \pm standard errors of the means of BFI (BioFilm Indice) for at least three independent replicates are presented. Statistical differences between each strain and their mutants at each time were obtained by using two-way Anova test, followed by Dunnett's multiple comparisons test.

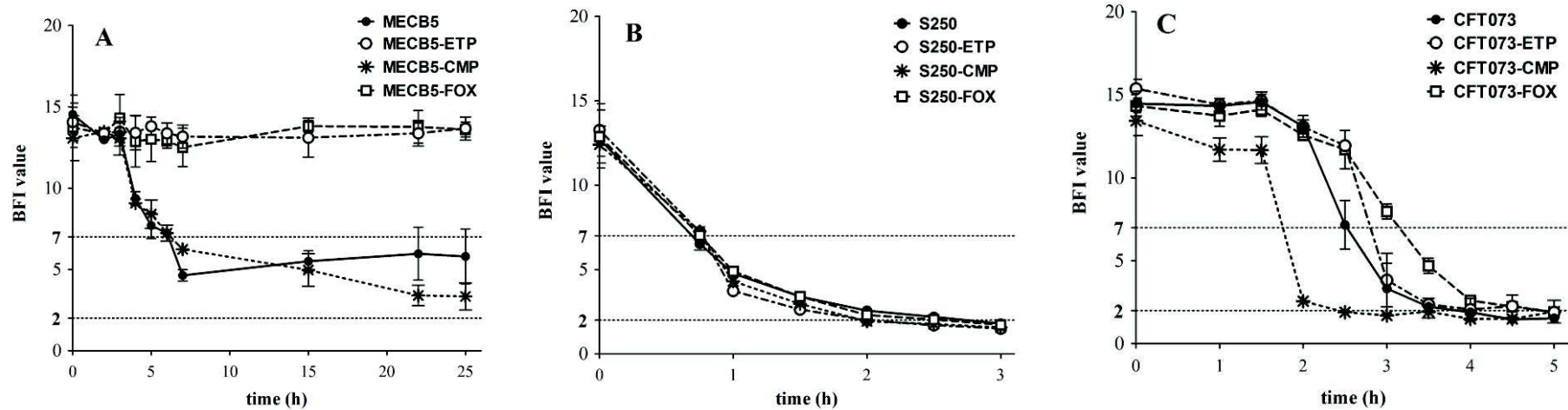


Table 1. Main characteristics and virulence traits of the *E. coli* clinical isolates used in this study.

Strain	ST, subclone	ESBL	Phylogroup	Virotype	Source	Virulence factors encoding gene	Reference
MECB5	131, <i>H30-Rx</i>	CTX-M-15	B2	C	Urine (cystitis) 2004	<i>iha, fimH, sat, fyuA, iutA, kpsM II-K5, usp, traT, ompT, iss, malX, irp2</i>	(4, 22, 23)
S250	131, <i>H22</i>	0	B2	D	Stools of a healthy subject 2006	<i>fimH, fyuA, iutA, kpsM II-K5, usp, tratT, ompT, iss, malX, irp2, ibeA</i>	(7, 23, Nicolas-Chanoine personnel data)
CFT073	73	0	B2	NA	Blood (pyelonephritis) 1989	<i>fimH, sat, fyuA, iutA, kpsM II, ompT, malX, hlyA, papA, papE, sfa/foc, iroN, aer, papC, papG, hly, irp2</i>	(23, 24)

Table 2. Antibiotic susceptibility of the three parental uropathogenic *Escherichia coli* isolates and their isogenic mutants with and without the efflux pump inhibitor phenylalanine arginine β -naphthylamide (PA β N).

Strains	Times to select resistant mutants (days)	MICs ^a (μ g/ml) [with PA β N] ^b											
		AMX	AMC	FOX	CTX	CAZ	ETP	IMP	NAL	OFX	CMP	TET	TGC
		(≤ 8 , > 8) ^c	(≤ 8 , > 8)	(≤ 8 , > 16)	(≤ 1 , > 2)	(≤ 1 , > 4)	(≤ 0.5 , > 1)	(≤ 2 , > 8)	(≤ 16 , > 16)	(≤ 0.5 , > 1)	(≤ 8 , > 8)	(≤ 4 , > 8)	(≤ 1 , > 2)
MECB5		> 1024 [> 1024]	128 [128]	4 [4]	> 1024 [> 1024]	> 1024 [> 1024]	0.16 [0.16]	0.125 [0.125]	> 256 [> 256]	8 [2]	2 [0.5]	128 [128]	1 [0.5]
MECB5-ETP	80	> 1024 [> 1024]	> 128 [> 128]	16 [8]	> 1024 [> 1024]	> 1024 [> 1024]	2 [1]	0.5 [0.25]	> 256 [> 256]	16 [4]	2 [0.5]	256 [128]	1 [0.5]
MECB5-CMP	80	> 1024 [> 1024]	128 [128]	16 [4]	> 1024 [> 1024]	> 1024 [> 1024]	0.16 [0.08]	0.125 [0.25]	> 256 [> 256]	32 [8]	32 [4]	256 [128]	2 [1]
MECB5-FOX	70	> 1024 [> 1024]	> 128 [> 128]	32 [8]	> 1024 [> 1024]	> 1024 [> 1024]	1 [1]	0.25 [0.5]	> 256 [> 256]	64 [8]	8 [0.5]	> 256 [256]	2 [1]
S250		8 [8]	8 [8]	2 [2]	0.125 [0.125]	0.25 [0.125]	0.016 [0.008]	0.25 [0.25]	8 [1]	0.063 [0.031]	2 [0.5]	2 [1]	0.25 [0.125]
S250-ETP ^d	no	8 [8]	8 [8]	4 [2]	0.125 [0.125]	0.25 [0.25]	0.016 [0.016]	0.25 [0.25]	8 [2]	0.063 [0.063]	2 [0.5]	2 [1]	0.25 [0.25]
S250-CMP	60	8 [8]	8 [8]	32 [4]	0.25 [0.125]	0.5 [0.25]	0.016 [0.016]	0.25 [0.25]	16 [2]	0.5 [0.063]	64 [4]	8 [4]	1 [0.25]
S250-FOX	70	16 [16]	16 [16]	64 [8]	0.5 [0.25]	0.5 [0.25]	0.016 [0.016]	0.25 [0.25]	16 [1]	0.063 [0.063]	4 [1]	2 [2]	0.5 [0.25]
CFT073		8 [8]	8 [8]	2 [1]	0.063 [0.063]	0.125 [0.125]	0.008 [0.016]	0.125 [0.125]	8 [1]	0.063 [0.063]	2 [0.5]	2 [1]	0.25 [0.25]
CFT073-ETP ^d	no	8 [8]	8 [8]	4 [2]	0.063 [0.063]	0.25 [0.25]	0.016 [0.016]	0.125 [0.125]	8 [2]	0.063 [0.063]	2 [0.5]	2 [2]	0.5 [0.25]
CFT073-CMP	90	8 [8]	8 [8]	16 [4]	0.125 [0.063]	0.25 [0.125]	0.008 [0.016]	0.125 [0.125]	64 [2]	0.25 [0.063]	64 [8]	8 [2]	1 [0.25]
CFT073-FOX	100	16 [16]	16 [16]	64 [8]	0.5 [0.25]	0.5 [0.25]	0.008 [0.016]	0.125 [0.125]	32 [2]	0.063 [0.063]	8 [1]	2 [2]	0.25 [0.25]

^a MICs, Minimum Inhibitory Concentrations; AMX, amoxicillin; AMC, amoxicillin associated with clavulanic acid ; FOX, cefoxitin; CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; ETP, ertapenem; IMP, imipenem; NAL, nalidixic acid; OFX, ofloxacin; CIP, ciprofloxacin; CMP, chloramphenicol; TET, tetracycline; TGC, tigecycline.

^b The MICs values obtained in the presence of efflux pump inhibitors (PA β N at 25 μ g/mL) are shown in brackets.

^c The breakpoints according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) are given in parentheses.

^d For S250 and CFT073 strains, continuous subculture in sub-inhibitory concentration of ETP failed to select resistance to this antibiotic after 150 days of culture

Table 3. Analysis of immunodetected membrane protein in MECB5, S250, CFT073 and their *in vitro*-selected mutants.

Strain	Membrane protein content				
	AcrA	AcrB	TolC	OmpC	OmpF
MECB5	+/-	+	+	++	++
MECB5-ETP	+	+	+	-	-
MECB5-CMP	++	++	++	+	+
MECB5-FOX	++	+	++	-	-
S250	+	+	+/-	++	++
S250-CMP	++	++	+/-	+	+
S250-FOX	++	++	+	-	-
CFT073	+	+/-	+	+	+
CFT073-CMP	++	+	++	+	+
CFT073-FOX	++	++	++	+	+

Table 4. Lethal time 50 % (LT50) of *Caenorhabditis elegans* infected with MECB5, S250, CFT073 parental strains and their respective mutants.

Differences in survival rates were tested by a log-rank (Mantel-cox) test for statistical significance. $P < 0.05$ was considered to reflect a statistically significant difference

Strain	LT50 in days (Mean \pm SE)	<i>p</i> value (studied strain vs OP50)	<i>p</i> value (mutant vs parental strain)
OP50	7 \pm 0.5	NA	NA
MECB5	5 \pm 0.5	< 0.0001	NA
MECB5-ETP	6 \pm 0.5	0.0009	0.0007
MECB5-CMP	4 \pm 0.5	< 0.0001	0.0006
MECB5-FOX	6 \pm 0.5	0.0064	< 0.0001
S250	5 \pm 0.5	< 0.0001	NA
S250-CMP	4 \pm 0.5	< 0.0001	0.0019
S250-FOX	6 \pm 0.5	0.0016	0.0003
CFT073	4 \pm 0.5	< 0.0001	NA
CFT073-CMP	4.5 \pm 0.5	< 0.0001	0.5842 (NS)
CFT073-FOX	6 \pm 0.5	0.0069	< 0.0001

SE, Standard Error ; NA, Not Applicable ; NS, Non-Significant

Figure S1. Relative mRNA expression level of gene implicated in MDR regulation (A), membrane efflux (B), permeability (C) for the ST131 *H22 E. coli* S250 and its mutants *in vitro*-selected by ertapenem (ETP), chloramphenicol (CMP) and cefoxitin (FOX).

The log-transformed averages of relative fold change of mutants to the parent strain for each antibiotic are presented. The error bars represent the standard deviation from three different RNA preparations. Significant differences from parent S250 using Dunnett's test are indicated by * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) and *** ($p < 0.001$).

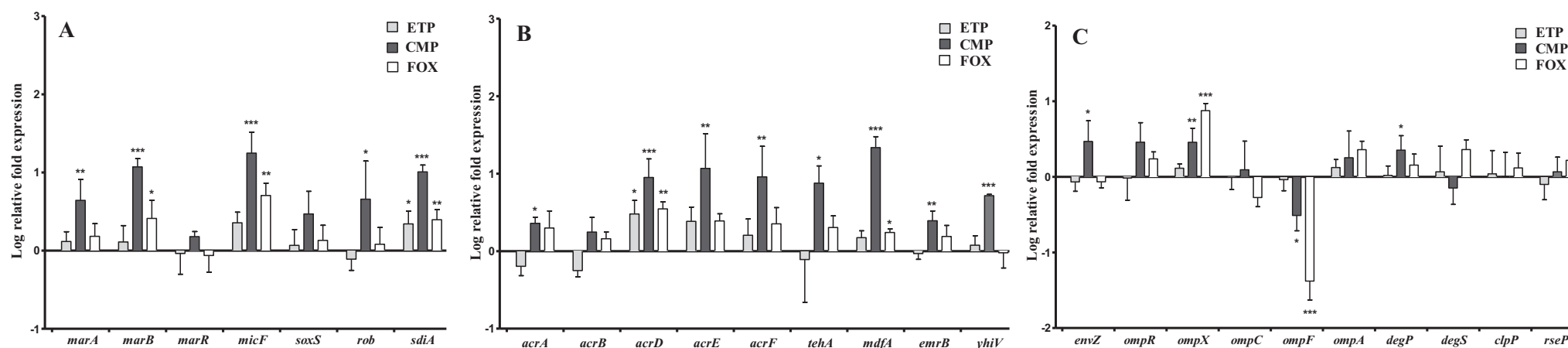


Figure S2. Relative mRNA expression level of gene implicated in MDR regulation (A), membrane efflux (B), permeability (C) for the reference strain *E. coli* CFT073 and its mutants *in vitro*-selected by ertapenem (ETP), chloramphenicol (CMP) and cefoxitin (FOX).

The log-transformed averages of relative fold change of mutants to the parent strain for each antibiotic are presented. The error bars represent the standard deviation from three different RNA preparations. Significant differences from parent CFT073 using Dunnett's test are indicated by * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) and *** ($p < 0.001$).

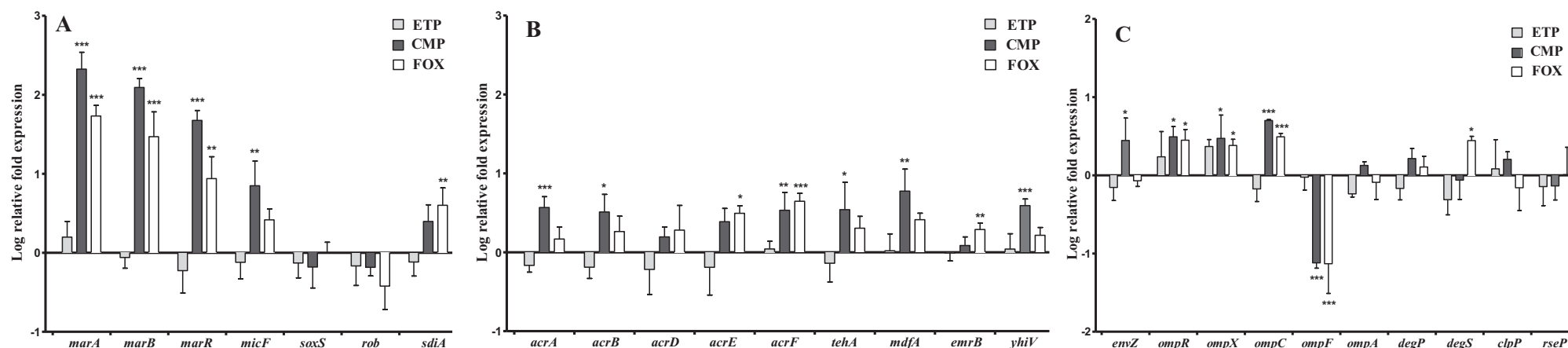


Table S1. Primers used in the study.

Primer use and target function	Target region	Primer name	Oligonucleotide sequence	Tm (°C)	Reference
Sequencing					
Global regulator of drug resistance	<i>marOR</i>	MarOR orab2	5'-GCTAGCCTTGCATCGCAT-3'	56	[1]
		MarOR orlR	5'-GAATGGTAATAGCGTCAG-3'	51,4	
	<i>acrR</i>	acrFR1	5'-CTAACGCCTGTAAATTCACG-3'	55,3	[1]
		acrRV1	5'-CCAGGAAAAATCCTGGAGTCAG-3'	60,3	
	<i>soxRS</i>	SoxRS seq_F	5'-GGCGAAGCTTCCGCAGGTGTTTATGC-3'	68	[2]
		SoxRS seq_R	5'-CGTCGGGGGAAGCTTTC CTGTGTACC-3'	69,5	
RT-PCR					
Housekeeping gene	<i>gapA</i>	GAPDH_F	5'-ACTTACGAGCAGATCAAAGC-3'	55,3	[3]
		GAPDH_R	5'-AGTTTCACGAAGTTGTCGTT-3'	53,2	
Global regulator of drug resistance	<i>marA</i>	marA_F	5'-CATAGCATTTTGGACTGGAT-3'	53,2	[3]
		marA_R	5'-TACTTTCCTTCAGCTTTTGC-3'	53,2	
	<i>marB</i>	marB_F	5'-ATAGCAGCTGCGCTTATTC-3'	54,5	[3]
		marB_R	5'-ACTTATCACTGCCAGTACCC-3'	57,3	
	<i>marR</i>	marR_F	5'-AGCGATCTGTTCAATGAAAT-3'	51,1	[3]
		marR_R	5'-TTCAGTTCAACCGGAGTAAT-3'	53,2	
	<i>soxS</i>	soxS_F	5'-CCATTGCGATATCAAAAATC-3'	51,1	[3]
		soxS_R	5'-ATCTTATCGCATGGATTGAC-3'	53,2	
	<i>rob</i>	rob_F	5'-GTCGTCTTTATCCTGACTCG-3'	57,3	[3]
		rob_R	5'-TTTGTCAACCCTGGAAGATAC-3'	55,3	
	<i>envZ</i>	envZ_F	5'-CGTTGAGGTCAACAAAAGTT-3'	53,2	[3]
		envZ_R	5'-GTCGGTTCTGGATACGAATA-3'	55,3	
	<i>micF</i>	micF_F	5'-TCATCATTAAC TTTATT TATTACCG-3'	53,1	[3]
		micF_R	5'-GCATCCGGTTGAAATAGG-3'	53,7	
	<i>sdiA</i>	sdiA_F	5'-CTTTCGCGCACCAAGTAAGT-3'	59,4	[4]
		sdiA_R	5'-CGCAGAAGAGGTCTACCATG-3'	59,4	
Efflux transporter	<i>acrA</i>	acrA_F	5'-CTTAGCCCTAACAGGATGTG-3'	57,3	[3]
		acrA_R	5'-TTGAAATTACGCTTCAGGAT-3'	51,1	
	<i>acrB</i>	acrB_F	5'-CGTACACAGAAAGTGCTCAA-3'	55,3	[3]
		acrB_R	5'-CGCTTCAACTTTGTTTTCTT-3'	51,1	
	<i>acrD</i>	acrD_F	5'-GATTATCTTAGCCGCTTCAA-3'	53,2	[3]
		acrD_R	5'-CAATGGAGGCTTTAACAAAC-3'	53,2	

Outer membrane permeability	<i>acrE</i>	acrE_F	5'-GCCCTCCTTTATTCTGATCT-3'	55,3	[3]
		acrE_R	5'-GGCTATACGATAAGCATTGG-3'	55,3	
	<i>acrF</i>	acrF_F	5'-TAGCAATTTTCCTTTGTGGTT-3'	51,1	[3]
		acrF_R	5'-CCTTTACCCTCTTCTCCAT-3'	55,3	
	<i>emrB</i>	emrB_F	5'-ATTATGTATGCCGTCTGCTT-3'	53,2	[3]
		emrB_R	5'-TTCGCGTAAAGTTAGAGAGG-3'	55,3	
	<i>mdfA</i>	mdfA_F	5'-TTTATGCTTTCGGTATTGGT-3'	51,1	[3]
		mdfA_R	5'-GAGATTAAACAGTCCGTTGC-3'	55,3	
	<i>tehA</i>	tehA_F	5'-TGCTTCATTCTGGAGTTTCT-3'	53,2	[3]
		tehA_R	5'-TCATTCTTTGTCCTCTGCTT-3'	53,2	
	<i>yhiV (mdtF)</i>	yhiV_F	5'-GCACTCTATGAGAGCTGGTC-3'	59,4	[3]
		yhiV_R	5'-CCTTCTTTCTGCATCATCTC-3'	55,3	
	<i>ompF</i>	ompF_F	5'-GAACTTCGCTGTTTCAGTACC-3'	57,3	[3]
		ompF_R	5'-CGTACTTCAGACCAGTAGCC-3'	59,4	
	<i>ompC</i>	ompC_F	5'-CTTCAAAGGTGAAACTCAGG-3'	55,3	[3]
		ompC_R	5'-GTTGTCAGAACCGTAGGTGT-3'	57,3	
	<i>ompA</i>	ompA_F	5'-ACGACTGGTTAGGTCGTATG-3'	57,3	[3]
		ompA_R	5'-ACGTTGGATTTAGTGTCTGC-3'	55,3	
	<i>ompX</i>	ompX_F	5'-ACCTGAAATACCGCTATGAA-3'	53,2	[3]
		ompX_R	5'-TCAGTGGTCTGGAATTTACC-3'	55,3	
	<i>ompR</i>	ompR_F	5'-GACGTCTTCGTAGTCAGAGC-3'	59,4	[3]
		ompR_R	5'-TTGAACTTACCGAAAGCAAT-3'	51,1	
	<i>degP</i>	degP_F	5'-TGGTAGTGAACAACGTGAAA-3'	53,2	[3]
		degP_R	5'-AACAGGTAGATGGTGCTGTC-3'	57,3	
	<i>clpP</i>	clpP_F	5'-CAAAAGGTAAACGTTTTTGC-3'	51,1	[3]
		clpP_R	5'-AATGATTGACCCGTATGAAG-3'	53,2	
	<i>rseP</i>	rseP_F	5'-TTGTTTATTACCTGCCGTTT-3'	51,1	[3]
		rseP_R	5'-ATTAACAGCACCAGCAGAAT-3'	53,2	
	<i>degS</i>	degS_F	5'-TTCCAGTTAGCAACCAAAAT-3'	51,1	[3]
		degS_R	5'-TGACACTTCATTAACCACGA-3'	53,2	

References supplementary data

1. **Nicoloff H, Perreten V, Levy SB.** 2007. Increased genome instability in *Escherichia coli* lon mutants: Relation to emergence of multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants caused by insertion sequence elements and large tandem genomic amplifications. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:1293–1303.
2. **Koutsolioutsou A, Peña-Llopis S, Demple B.** 2005. Constitutive *soxR* mutations contribute to multiple-antibiotic resistance in clinical *Escherichia coli* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:2746–2752.
3. **Viveiros M, Dupont M, Rodrigues L, Couto I, Davin-Regli A, Martins M, Pagès JM, Amaral L.** 2007. Antibiotic stress, genetic response and altered permeability of *E. coli*. *PLoS One* **2**.
4. **Tavío MM, Aquili VD, Poveda JB, Antunes NT, Sánchez-Céspedes J, Vila J.** 2010. Quorum-sensing regulator *sdiA* and *marA* overexpression is involved in in vitro-selected multidrug resistance of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* **65**:1178–1186.

DISCUSSION - PERSPECTIVES

Ce travail de thèse s'inscrit dans la continuité des travaux menés sur l'antibiorésistance depuis plusieurs années au sein de l'Unité INSERM 1047 de la Faculté de Médecine de Montpellier-Nîmes. Il avait deux objectifs principaux : *i*) la surveillance épidémiologique et la caractérisation moléculaire des entérobactéries MDR isolées au niveau régional, national et en Algérie où cette épidémiologie est peu connue, *ii*) l'étude des modulations de l'influx et de l'efflux membranaires et leur impact sur le fitness et le potentiel de virulence de *E. coli* ST131, un clone MDR mondialement répandu.

1 Multirésistance aux antibiotiques chez les entérobactéries

Certaines EPC sont endémiques dans plusieurs régions du globe : les EPC de type NDM dans le sous-continent indien, de type KPC et VIM en Grèce, ou encore de type OXA-48 en Turquie et dans certains pays d'Afrique du Nord (4). Leur émergence en France est un sujet de préoccupations majeur, car l'implantation de telles bactéries conduit à des situations dramatiques d'impasse thérapeutique chez les patients infectés.

Depuis 2011, notre position de Centre Expert de la MDR en Languedoc-Roussillon nous permet de surveiller la dissémination des BHRe dans notre région. Si le nombre d'EPC identifiées était faible au début de cette surveillance (7 en 2011), il ne cesse de s'accroître chaque année (67 en 2014), suivant la tendance observée au niveau national (<http://www.invs.sante.fr/>). Une autre évolution concerne le type d'enzymes impliquées. Les enzymes OXA-48-like, seules carbapénémases identifiées en 2011, restent les enzymes majoritaires mais les MBL de type NDM apparaissent de plus en plus fréquemment impliquées (près d'un tiers des EPC depuis 2014). Cette situation est particulièrement préoccupante car le gène *bla*NDM est porté par plusieurs groupes de plasmides facilement transférables à différentes entérobactéries, dont *E. coli*, l'espèce majoritaire de la flore intestinale aérobie facultative et la principale bactérie impliquée dans les infections communautaires (3, 444). Les méthodes de typage moléculaire (rep-PCR, MLST) nous ont permis de suivre l'émergence de plusieurs clones dans notre région ou au niveau national. Ces clones « à succès » concernent essentiellement des *K. pneumoniae* productrices d'OXA-48 (ST101, ST15, ST395 et ST405) ou de NDM (ST147).

Les EPC nécessitent d'être rapidement et efficacement détectées afin de prendre au plus vite les mesures préventives et thérapeutiques appropriées vis à vis des patients qui les hébergent.

Seule une telle stratégie d'identification rapide peut permettre de limiter la diffusion des EPC en isolant les patients porteurs. Par ailleurs, l'investigation des épisodes par les équipes d'hygiène doit inclure la recherche d'un réservoir environnemental. En effet, nous avons mis en évidence une contamination de l'environnement dans plusieurs épidémies à *K. pneumoniae* productrices de NDM ou OXA-48 ayant touché différents établissements de notre région (CHU de Montpellier et Nîmes, CH de Béziers et Carcassonne). Au cours de ces différentes épidémies, la contamination des siphons au niveau des points d'eau des chambres occupées par les patients porteurs semble expliquer certaines transmissions croisées entre des patients dont les durées de séjour ne coïncidaient pas.

Malgré le nombre croissant de cas rapportés, nous avons montré que les taux de prévalence (0.08% toutes espèces confondues) et d'incidence (0.0041 pour 1000 jours d'hospitalisation) des infections à EPC étaient très faibles dans les établissements français en 2011-2012. Les colonisations digestives semblaient elles aussi exceptionnelles (0.09%) dans la population hospitalisée en 2012 dans le Sud de la France. Notre pays n'est donc pas dans une situation d'endémie. Le principal mécanisme de résistance aux carbapénèmes reste l'imperméabilité membranaire. Toutefois, nous devons maintenir notre vigilance quant à la diffusion des clones et des plasmides épidémiques en poursuivant nos études épidémiologiques.

Enfin, nous avons identifié pour la première fois l'enzyme OXA-48 sur le territoire algérien, chez une souche de *E. coli* isolée dans un hôpital militaire de la région de Constantine. Alors que des liens avaient été établis entre des infections ou colonisations à EPC de type OXA-48 en France et la notion de précédente hospitalisation en Algérie (445, 446), cette enzyme n'avait jamais été rapportée dans ce pays. Depuis cette étude, une épidémie à *K. pneumoniae* OXA-48 touche l'hôpital universitaire de Constantine (446).

Par ailleurs, nous avons décrit pour la première fois le clone ST131 en Algérie, dans ce même hôpital militaire de Constantine. Sa prévalence était de 11.9% parmi les *E. coli* producteurs de BLSE, plus faible que celle rapportée en Europe (23 – 66%) (182, 203–208) ou aux Etats-Unis (54 à 64%) (209, 210).

Parallèlement à ces études d'épidémiologie moléculaire de la multirésistance, la seconde partie de ma thèse, plus « fondamentale », s'est intéressée aux modifications de la perméabilité et de l'efflux membranaires de *E. coli* ST131, l'exemple-type d'un clone MDR.

2 Modulation de l'influx et de l'efflux membranaires chez *E. coli* ST131

Le Pr Lavigne a participé à l'étude du clone *E. coli* ST131 dès sa première description dans huit pays en 2008 (11). Par la suite, notre équipe a montré la présence de ce clone dans d'autres pays (447, 448) et dans d'autres réservoirs, comme le réservoir animal (242). En collaboration avec le Pr Nicolas-Chanoine, notre équipe a également montré que la virulence de ce clone était inférieure à celle des autres *E. coli* de phylogroupe B2, chez deux modèles disponibles au sein de notre laboratoire : le nématode *C. elegans* et les embryons de poissons zèbre (276).

En collaboration avec le Pr Nicolas-Chanoine et le Dr Pagès, notre Unité de recherche s'est intéressée aux mécanismes de résistance aux antibiotiques par défaut de perméabilité membranaire et surproduction de systèmes d'efflux, chez deux entérobactéries présentes en faible quantité dans la microflore du tube digestif et classiquement responsables d'infections associées aux soins : *E. aerogenes* et *K. pneumoniae* (361, 413, 436, 449). Il a été montré que ces mécanismes étaient impliqués dans la MDR, mais également dans la modification du potentiel de virulence de ces entérobactéries (18, 20, 436). Dans le cadre de notre programme de surveillance des bacilles à Gram négatif résistants aux carbapénèmes en Languedoc-Roussillon, nous nous sommes aperçus que la majorité des souches de *E. coli* envoyées à notre Laboratoire pour expertise ne produisait pas de carbapénémases. L'acquisition de la résistance aux carbapénèmes, chez ces souches, résultait d'un défaut d'accumulation de l'antibiotique à l'intérieur de la cellule bactérienne par probable imperméabilité membranaire. De plus, dans un programme de surveillance des *E. coli* résistants aux C3G dans les hôpitaux du Sud de la France entre 2004 et 2009, la surexpression des systèmes d'efflux concernait 38,5% des 52 isolats cliniques étudiés (Jean-Philippe Lavigne, données personnelles). *E. coli* est donc une espèce qui, comme les *Enterobacter* spp. et *K. pneumoniae*, est concernée par les modifications de perméabilité membranaire. Il est ainsi apparu intéressant d'étudier ces modifications chez le clone regroupant la majorité des isolats de *E. coli* MDR, le clone ST131 (12).

L'objectif de notre travail a été de *i)* comprendre les mécanismes régulant la perméabilité membranaire du clone *E. coli* ST131, *ii)* déterminer si l'altération de l'influx, la surexpression

de l'efflux, ou l'association des deux mécanismes avait un impact sur la virulence *in vivo* et *iii*) évaluer si ces mécanismes de résistance étaient à l'origine d'une modification de fitness des souches (mobilité, capacité à former du biofilm).

Pour ce faire, trois souches ont été élevées en conditions subinhibitrices d'antibiotiques connus pour leur capacité à interagir avec la perméabilité membranaire (ETP, FOX) et/ou les systèmes d'efflux (CMP, FOX) (362, 413, 450, 451). Les souches MECB5 et S250 étaient représentatives, respectivement, des sous-clones *H30-Rx* et *H22* du clone ST131 (11, 224, 452), la souche CFT073 était représentative des UPEC non-ST131 (453). La capacité qu'ont les bactéries à croître en présence de concentrations subinhibitrices d'antibiotiques joue un rôle essentiel dans la crise actuelle de la MDR. Des concentrations sublétales en antibiotiques sont observées dans de nombreux milieux naturels, elles se produisent également chez les patients et sont susceptibles d'accélérer l'évolution de la résistance en augmentant la mutagenèse et/ou la recombinaison (454, 455).

Des mutants résistants à ces antibiotiques ont été sélectionnés pour toutes les souches à l'exception des souches initialement sensibles aux C3G, S250 et CFT073, pour lesquelles aucune variation des CMI de l'ertapénème n'a été notée. Ces résultats sont en accord avec ceux de Tängdén et Girlich, qui ont également observé que la résistance aux carbapénèmes, chez *E. coli* n'était sélectionnée que parmi les isolats producteurs de BLSE (450, 456). Pour la souche MECB5-ETP, l'analyse de l'expression des gènes et des OMP par qRT-PCR et WB a montré un défaut d'expression des deux porines majeures OmpF et OmpC. La perte d'expression du gène *ompC* était particulièrement importante, comme cela avait été observé par Girlich et coll. (450), et paraissait liée à la surexpression du gène codant pour le répresseur OmpX. La surexpression du gène *bla_{CTX-M-15}*, qui a une faible activité d'hydrolyse de l'ETP (457), semblait également contribuer à l'acquisition de la résistance à cet antibiotique.

La résistance sélectionnée chez les mutants élevés en milieu CMP était associée à des CMI supérieures de la FOX, des quinolones et des cyclines. La récupération de la sensibilité en présence de PAβN suggérait que la résistance était due à une augmentation de l'efflux. La surexpression des sous-unités constitutives de la pompe majeure des entérobactéries, AcrAB-TolC, a été confirmée par Western Blot chez ces mutants. De façon intéressante, d'autres gènes codant pour des systèmes d'efflux moins fréquemment décrits comme impliqués dans la résistance aux antibiotiques (341) étaient surexprimés: *acrEF*, *mdfA*, *yhiV* (*mdtF*) et, dans une

moindre mesure, *acrD* et *tehA*, suggérant que l'augmentation de l'efflux chez *E. coli* est un phénomène global, qui implique plusieurs pompes appartenant à différentes familles.

La pression antimicrobienne induite par la FOX entraîne à la fois une augmentation de l'efflux et une réduction de l'influx. Les systèmes d'efflux étaient particulièrement surexprimés dans le cas du mutant MECB5-FOX chez lequel le répresseur AcrR n'était plus fonctionnel. Comme indiqué dans le paragraphe 4.2.1.4 de ce manuscrit, de nombreuses mutations inactivatrices du gène *acrR* ont été décrites chez les entérobactéries. A notre connaissance, c'est la première fois que l'association d'une délétion et d'une insertion d'IS1 est impliquée dans le décalage du cadre de lecture de *acrR*. Pour les trois mutants sélectionnés par la FOX, la perte de l'expression de *ompF* n'était pas associée à celle de *ompC*. Cette différence d'expression peut être expliquée par les activités accrues de *micF* et des gènes codant pour le système de contrôle à deux composants EnvZ-OmpR.

Les variations les plus importantes de l'efflux et de l'influx membranaires étaient observées chez les mutants pour lesquels le régulateur global de la MDR, MarR, n'était plus fonctionnel (MECB5-FOX, CFT073-CMP). Chez *E. coli*, une espèce dépourvue du système *ramR/ramA*, l'activation de MarA, objectivée chez la quasi-totalité des mutants générés, semble être le paramètre-clé de l'acquisition de la résistance. Les autres membres de la famille d'activateurs transcriptionnels AraC/XylS, SoxS et Rob, apparaissent moins impliqués dans la régulation de la MDR. En revanche, le récepteur du quorum sensing SdiA semble jouer un rôle important, notamment chez les souches ST131 pour lesquelles son activité était augmentée dans toutes les conditions de pression antibiotique. Son implication propre est difficilement appréciable dans cette étude, du fait de la surexpression concomitante de MarA chez la plupart des mutants ST131.

Le mutant ST131 H30-Rx élevé en conditions subinhibitrices de FOX a été obtenu rapidement (70 jours de subcultures) et possédait à la fois des mutations dans le régulateur global de la MDR (MarR) et le répresseur local de l'efflux (AcrR). Ces résultats interrogent quant à l'utilisation de la FOX dans le traitement prolongé des infections à *E. coli* producteurs de BLSE et le risque d'échec thérapeutique encouru (16, 17).

Jusqu'alors, peu d'études s'étaient intéressées à la relation entre les modifications de la barrière membranaire et la pathogénicité de *E. coli* (378, 379, 438). Dans ce travail, l'impact de ces modifications chez *E. coli* étaient en accord avec les travaux menés chez *K. pneumoniae*, *S. enterica* ou *E. aerogenes* (18–20, 436, 437). La surexpression des systèmes

d'efflux (mutants CMP) était associée à un potentiel de virulence augmenté chez *C. elegans*. A l'inverse, l'imperméabilité seule (mutant MECB5-ETP), ou associée à de l'efflux (mutants FOX), engendrait un allongement de la durée de survie des vers. Le potentiel de virulence inchangé observé chez la souche CFT073-CMP peut être expliqué par la diminution de l'expression de *ompF*, en réponse à la surexpression de *micF* chez ce mutant pour lequel le gène *marR* était prématurément interrompu par un codon stop. Une autre explication possible est que le modèle *C. elegans* pourrait être moins sensible dans l'étude des souches très virulentes, comme CFT073.

Par leurs pompes à efflux, les bactéries exportent des facteurs de virulence importants pour leur pathogénicité (adhésines, toxines, système de capture du fer) (390), ce qui permet d'expliquer l'augmentation du potentiel de virulence des mutants sélectionnés par CMP. Les sels biliaires et les acides gras, présents dans le tractus digestif de l'Homme et des animaux, sont également des substrats des pompes d'efflux (389). Il a été montré chez *S. enterica* qu'un système d'efflux AcrAB-TolC fonctionnel était indispensable à la colonisation persistante de l'intestin chez le poussin (19). Il serait intéressant d'étudier la capacité de colonisation digestive des mutants générés dans cette étude, par exemple chez un modèle murin prétraité par streptomycine comparable à celui utilisé par Vimont et coll. (264), afin de savoir si la surexpression de l'efflux représente un avantage dans la capacité de colonisation intestinale de *E. coli*.

Un autre facteur pourrait expliquer les variations de virulence observées *in vivo* : la modification du « fitness » des mutants générés. Nous avons ainsi montré que les mutants-CMP, qui étaient les plus virulents chez *C. elegans*, étaient également les mutants les plus mobiles lors des tests de « swimming ». A l'inverse, la capacité de « swimming » des mutants-FOX était très affectée. La mobilité a été décrite comme un facteur de pathogénicité important des UPEC (458) et on peut supposer que ces différents comportements ont pu influencer la virulence des souches. En revanche, la diminution du potentiel de virulence de la souche MECB5-ETP ne semble pas être liée à une variation de la mobilité de cette souche.

La formation de biofilm est un autre facteur de pathogénicité important puisqu'elle permet aux bactéries de se protéger de l'action du système immunitaire (270). En accord avec les travaux publiés récemment par Olesen et Shin (273, 274), nous avons montré que la souche MECB5 productrice de CTX-M-15 et appartenant au sous-clone H30-Rx n'était pas capable de former un biofilm précoce en 48h. La souche S250, qui appartient au sous-clone H22,

formait un biofilm précoce très rapidement. La capacité à former du biofilm ne semble donc pas expliquer le succès du sous-clone *H30-Rx*, largement dominant depuis le milieu des années 2000 (217, 273). La pression de sélection antibiotique influençait la capacité à former du biofilm de la même manière que la virulence : les cinétiques de production de biofilm étaient globalement accélérées chez les mutants sélectionnés par CMP et ralenties chez les mutants sélectionnés par ETP et FOX. Il a été rapporté que des concentrations subinhibitrices en antibiotiques (aminosides, tétracyclines, fluoroquinolones) favorisaient la formation de biofilm (459). De plus, l'expression des systèmes d'efflux est un facteur essentiel de la formation de biofilm chez *E. coli* (440). Le retard dans la formation de biofilm observée chez les mutants sélectionnés par FOX, malgré la surexpression des pompes à efflux, pourrait être expliqué par la moindre mobilité des souches, qui est un paramètre essentiel à l'organisation d'un biofilm chez *E. coli* (460). La diminution de la formation de biofilm chez les souches élevées par ETP pourrait provenir d'un effet inhibiteur des carbapénèmes, comme cela a été démontré chez *A. baumannii* (461).

Une analyse transcriptomique des mutants générés, par « RNA sequencing » ou « microarrays », fait partie de nos perspectives de recherche immédiates. Il serait intéressant d'étudier l'expression des gènes impliqués dans la virulence (systèmes de capture du fer, toxines, hémolysines, facteur de résistance à la bactéricidie du sérum, peptidases de la membrane externe, bactériocines...), l'adhésion (adhésines des *fimbriae*, recombinaisons impliquées dans le « *fim* switch », curline), la mobilité (régulateurs de la biosynthèse du flagelle), et la formation de biofilm (synthèse des polysaccharides de la matrice extracellulaire, régulateurs).

Il serait également intéressant de compléter les mutants présentant des mutations inactivatrices dans les régulateurs de la MDR (*marR* et/ou *acrR*) par des gènes codant pour des régulateurs fonctionnels et observer si les phénotypes de résistance et de virulence des souches parentales s'expriment à nouveau.

Un autre projet de recherche immédiat est l'analyse du potentiel de virulence chez un second modèle d'étude de la virulence *in vivo* disponible dans notre Unité : les embryons de poissons zèbre. Ce modèle, à la différence de *C. elegans*, est doté d'un système immunitaire adaptatif (462). De plus, l'embryon du poisson zèbre est transparent et de petite taille. Ces caractéristiques permettent, à la suite de l'injection intraveineuse d'une souche bactérienne

exprimant le gène codant pour la GFP, de suivre la progression de l'infection dans l'animal entier. Elles permettent également de suivre la réponse immunitaire mise en place par l'embryon suite à la bactériémie en marquant les macrophages ou les polynucléaires par un fluorochrome différent (463). Ce modèle serait donc un candidat idéal pour étudier la réponse de l'hôte vis-à-vis de l'infection par nos différents mutants de *E. coli*.

CONCLUSION

La diffusion des entérobactéries MDR à l'échelle mondiale constitue une menace de santé publique majeure. La première partie de cette thèse s'est intéressée à l'épidémiologie moléculaire des souches d'entérobactéries MDR isolées dans les infections et les colonisations des patients hospitalisés en Languedoc-Roussillon, en France, et dans un pays où cette épidémiologie est encore peu connue, l'Algérie. Nous avons montré, dans notre région et au niveau national, que la résistance aux carbapénèmes était essentiellement liée à des modifications de la perméabilité membranaire. Toutefois, des clones épidémiques producteurs de carbapénémases, qui regroupent notamment des isolats de *K. pneumoniae* producteurs des enzymes OXA-48 ou NDM, progressent actuellement dans le Sud de la France. La vigilance vis-à-vis de cette progression s'impose et de nouvelles études épidémiologiques seront menées dans les mois à venir.

Dans la seconde partie de ce travail, nous avons étudié les mécanismes régissant l'influx et l'efflux des antibiotiques chez le clone *E. coli* ST131. Nous avons mis en évidence une remarquable adaptabilité de ce clone mondial à la pression antibiotique. Chez les isolats appartenant au sous-clone en pleine expansion, H30-Rx, l'imperméabilité membranaire conduit à un niveau élevé de résistance à toutes les β -lactamines et laisse peu d'options thérapeutiques, au regard des co-résistances hébergées par ce sous-clone. Néanmoins, cette adaptation crée un désavantage physiologique associé à un faible potentiel de virulence de la bactérie. A l'inverse, les isolats surexprimant leurs systèmes d'efflux constituent une réelle menace en termes de capacité de colonisation et de virulence chez l'hôte.

Deux perspectives de recherche nous semblent actuellement prioritaires : *i)* l'étude des variations du profil transcriptomique des mutants d'influx et/ou d'efflux afin de comprendre quels sont les acteurs de la virulence, de la mobilité et de la formation du biofilm responsables des phénotypes observés, *ii)* l'étude de la virulence des mutants résistants chez un second modèle, les embryons de poissons zèbre, afin de mettre en évidence d'éventuelles modifications dans la réponse immunitaire de l'hôte à la suite de l'infection.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Cantón R, Coque TM.** 2006. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* **9**:466–475.
2. **Coque TM, Baquero F, Canton R.** 2008. Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Euro Surveill* **13**:pii: 19044.
3. **Nordmann P, Naas T, Poirel L.** 2011. Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* **17**:1791–8.
4. **Nordmann P, Poirel L.** 2014. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers in *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clin Microbiol Infect* **20**:821–830.
5. **Vardakas KZ, Tansarli GS, Rafailidis PI, Falagas ME.** 2012. Carbapenems *versus* alternative antibiotics for the treatment of bacteraemia due to *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β -lactamases: A systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* **67**:2793–2803.
6. **Tumbarello M, Trecarichi EM, De Rosa FG, Giannella M, Giacobbe DR, Bassetti M, Losito AR, Bartoletti M, Del Bono V, Corcione S, Maiuro G, Tedeschi S, Celani L, Cardellino CS, Spanu T, Marchese A, Ambretti S, Cauda R, Viscoli C, Viale P, ISGRI-SITA (Italian Study Group on Resistant Infections of the Società Italiana Terapia Antinfettiva).** 2015. Infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: differences in therapy and mortality in a multicentre study. *J Antimicrob Chemother* **70**:2133–43.
7. **Carbonne A, Arnaud I, Maugat S, Marty N, Dumartin C, Bertrand X, Bajolet O, Savey A, Fosse T, Eveillard M, Sénéchal H, Coignard B, Astagneau P, Jarlier V, Caillat-Vallet E, Garreau N, Hoff O, Simon L, Mariani S, Parneix P, Reyreud E, Sousa E, Trystram D, Lebascle K.** 2013. National multidrug-resistant bacteria (MDRB) surveillance in France through the RAISIN network: A 9 year experience. *J Antimicrob Chemother* **68**:954–959.
8. **Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ.** 2015. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol* **13**:269–284.
9. **Horcajada JP, Shaw E, Padilla B, Pintado V, Calbo E, Benito N, Gamallo R, Gozalo M, Rodríguez-Baño J.** 2013. Healthcare-associated, community-acquired and hospital-acquired bacteraemic urinary tract infections in hospitalized patients: A prospective multicentre cohort study in the era of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Infect* **19**:962–968.
10. **Chen YH, Ko WC, Hsueh PR.** 2013. Emerging resistance problems and future perspectives in pharmacotherapy for complicated urinary tract infections. *Expert Opin Pharmacother* **14**:587–96.
11. **Nicolas-Chanoine MH, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso MP, Caniça MM, Park YJ, Lavigne JP, Pitout J, Johnson JR.** 2008. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother* **61**:273–281.
12. **Johnson JR, Johnston B, Clabots C, Kuskowski MA, Castanheira M.** 2010. *Escherichia coli* sequence type ST131 as the major cause of serious multidrug-resistant *E. coli* infections in the United States. *Clin Infect Dis* **51**:286–294.
13. **Price LB, Johnson JR, Aziz M.** 2013. The epidemic of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 is driven by a single highly pathogenic subclone, H30-Rx. *MBio* **4**:e00377–13.
14. **Li XZ, Plésiat P, Nikaido H.** 2015. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev* **28**:337–418.
15. **Pagès JM, James CE, Winterhalter M.** 2008. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* **6**:893–903.
16. **Pilmis B, Parize P, Zahar JR, Lortholary O.** 2014. Alternatives to carbapenems for infections caused by ESBL-producing *Enterobacteriaceae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **33**:1263–1265.
17. **Kernéis S, Valade S, Geri G, Compain F, Lavollay M, Rostane H, Carbonnelle E, Mainardi JL.** 2015. Cefoxitin as a carbapenem-sparing antibiotic for infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Dis (Lond)* **47**:793–9.
18. **Bialek S, Lavigne JP, Chevalier J, Marcon E, Leflon-Guibout V, Davin A, Moreau R, Pagès JM, Nicolas-Chanoine MH.** 2010. Membrane efflux and influx modulate both multidrug resistance and virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a *Caenorhabditis elegans* model. *Antimicrob Agents Chemother* **54**:4373–4378.
19. **Buckley AM, Webber MA, Cooles S, Randall LP, La Razione RM, Woodward MJ, Piddock LJ V.** 2006. The AcrAB-TolC efflux system of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium plays a role in pathogenesis. *Cell Microbiol* **8**:847–856.
20. **Lavigne JP, Sotto A, Nicolas-Chanoine MH, Bouziges N, Bourg G, Davin-Regli A, Pagès JM.** 2012. Membrane permeability, a pivotal function involved in antibiotic resistance and virulence in *Enterobacter aerogenes* clinical isolates. *Clin Microbiol Infect* **18**:539–545.

21. **World Health Organization.** 2014. Antimicrobial resistance: Global report on surveillance 2014. available at <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillance-report/en/>.
22. **Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL.** 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* **18**:268–81.
23. **Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Kaye KS, Ben-Ami R, Schwartz D, Carmeli Y.** 2006. Clinical and economic impact of bacteremia with extended-spectrum- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:1257–1262.
24. **Spratt BG.** 1975. Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K12. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**:2999–3003.
25. **Tomasz A.** 1986. Penicillin-binding proteins and the antibacterial effectiveness of β -lactam antibiotics. *Rev Infect Dis* **8**:S260–78.
26. **Ambler R.** 1980. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc L B Biol Sci* **289**:321–31.
27. **Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA.** 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* **39**:1211–1233.
28. **Bush K, Jacoby GA.** 2010. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **54**:969–76.
29. **Perez F, Endimiani A, Hujer KM BR.** 2007. The continuing challenge of ESBLs. *Curr Opin Pharmacol* **7**:459–469.
30. **Brun-Buisson C, Legrand P, Philippon A, Montravers F, Ansquer M, Duval J.** 1987. Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet* **2**:302–6.
31. **Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff-Neutzling RM, Wiedemann B.** 1985. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* **28**:302–7.
32. **Sirost D, Sirost J, Labia R, Morand A, Courvalin P, Darfeuille-Michaud A, Perroux R, Cluzel R.** 1987. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel β -lactamase. *J Antimicrob Chemother* **20**:323–34.
33. **Bradford PA.** 2001. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* **14**:933–51.
34. **Matsumoto Y, Ikeda F, Kamimura T, Yokota Y, Mine Y.** 1988. Novel plasmid-mediated beta-lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* **32**:1243–6.
35. **Bonnet R.** 2004. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:1–14.
36. **Humeniuk C, Arlet G, Gautier V, Grimont P, Labia R, Philippon A.** 2002. β -lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:3045–9.
37. **Poirel L, Kämpfer P, Nordmann P.** 2002. Chromosome-encoded Ambler class A β -lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:4038–40.
38. **Olson AB, Silverman M, Boyd DA, McGeer A, Willey BM, Pong-Porter V, Daneman N, Mulvey MR.** 2005. Identification of a progenitor of the CTX-M-9 group of extended-spectrum β -lactamases from *Kluyvera georgiana* isolated in Guyana. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:2112–15.
39. **Poirel L, Decousser JW, Nordmann P.** 2003. Insertion sequence *ISEcp1B* is involved in expression and mobilization of a *bla*(CTX-M) β -lactamase gene. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:2938–45.
40. **Eckert C, Gautier V, Saladin-Allard M, Hidri N, Verdet C, Ould-Hocine Z, Barnaud G, Delisle F, Rossier A, Lambert T, Philippon A, Arlet G.** 2004. Dissemination of CTX-M-type β -lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Paris, France. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:1249–55.
41. **Hawkey PM, Jones AM.** 2009. The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother* **64**:i3–10.
42. **European Centre for Disease Prevention and Control.** Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2013. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2014.
43. **Naas T, Poirel L, Nordmann P.** 2008. Minor extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect* **14**:42–52.

44. **Leotard S, Poirel L, Leblanc PE, Nordmann P.** 2001. *In vivo* selection of oxacillinase-mediated ceftazidime resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Drug Resist* **7**:273–5.
45. **Bauernfeind A, Chong Y, Schweighart S.** 1989. Extended broad spectrum β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. *Infection* **17**:316–21.
46. **Jacoby GA.** 2009. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* **22**:161–82.
47. **Philippon A, Arlet G, Jacoby GA.** 2002. Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:1–11.
48. **Pitout JD.** 2012. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: an update on antimicrobial resistance, laboratory diagnosis and treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther* **10**:1165–76.
49. **Queenan AM, Bush K.** 2007. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* **20**:440–58.
50. **Carmeli Y, Akova M, Cornaglia G, Daikos GL, Garau J, Harbarth S, Rossolini GM, Souli M, Giamarellou H.** 2010. Controlling the spread of carbapenemase-producing Gram-negatives: therapeutic approach and infection control. *Clin Microbiol Infect* **16**:102–11.
51. **Vaux S, Carbonne A, Thiolet JM, Jarlier V, Coignard B, Groups EL.** 2011. Emergence of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in France, 2004 to 2011. *Euro Surveill* **16**(22):pii=19880.
52. **Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC.** 2001. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:1151–61.
53. **Bradford PA, Bratu S, Urban C, Visalli M, Mariano N, Landman D, Rahal JJ, Brooks S, Cebular S, Quale J.** 2004. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 beta-lactamases in New York City. *Clin Infect Dis* **39**:55–60.
54. **Cai JC, Zhou HW, Zhang R, Chen GX.** 2014. Emergence of *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli* isolates possessing the plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC-2 in intensive care units of a Chinese hospital. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:2014–18.
55. **Lomaestro BM, Tobin EH, Shang W, Gootz T.** 2006. The spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* to upstate New York. *Clin Infect Dis* **43**:26–8.
56. **Tsakris A, Kristo I, Poulou A, Markou F, Ikonomidis A, Pournaras S.** 2008. First occurrence of KPC-2-possessing *Klebsiella pneumoniae* in a Greek hospital and recommendation for detection with boronic acid disc tests. *J Antimicrob Chemother* **62**:1257–60.
57. **Nordmann P, Cuzon G, Naas T.** 2009. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* **9**:228–36.
58. **Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB, Srinivasan A, Navon-Venezia S, Carmeli Y, Brolund A, Giske CG.** 2009. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:3365–70.
59. **Navon-Venezia S, Leavitt A, Schwaber MJ, Rasheed JK, Srinivasan A, Patel JB, Carmeli Y, Israeli KPC Kpn Study Group.** 2009. First report on a hyperepidemic clone of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Israel genetically related to a strain causing outbreaks in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:818–20.
60. **Baraniak A, Grabowska A, Izdebski R, Fiett J, Herda M, Bojarska K, Zabicka D, Kania-Pudło M, Mlynarczyk G, Zak-Pulawska Z, Hryniewicz W, Gniadkowski M, KPC-PL Study Group.** 2011. Molecular characteristics of KPC-producing *Enterobacteriaceae* at the early stage of their dissemination in Poland, 2008-2009. *Antimicrob Agents Chemother* **55**:5493–9.
61. **Sabath LD, Abraham EP.** 1966. Zinc as a cofactor for cephalosporinase from *Bacillus cereus* 569. *Biochem J* **98**:11C–3C.
62. **Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM.** 2011. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? *Lancet Infect Dis* **11**:381–93.
63. **Galleni M, Lamotte-Brasseur J, Rossolini GM, Spencer J, Dideberg O, Frère JM, Metallo-beta-lactamases Working Group.** 2001. Standard numbering scheme for class B beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:660–3.
64. **Garau G, García-Saez I, Bebrone C, Anne C, Mercuri P, Galleni M, Frère JM, Dideberg O.** 2004. Update of the standard numbering scheme for class B β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:2347–9.

65. **Prosperi-Meys C, Llabres G, de Seny D, Soto RP, Valladares MH, Laraki N, Frere JM, Galleni M.** 1999. Interaction between class B β -lactamases and suicide substrates of active-site serine β -lactamases. *FEBS Lett* **443**:109–11.
66. **Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR.** 2009. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, *bla*(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:5046–54.
67. **Hammerum A, Toleman M, Hansen F, Kristensen B, Lester C, Walsh T, K. F.** 2010. Global spread of New Delhi metallo- β -lactamase 1. *Lancet Infect Dis* **10**:829–30.
68. **Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA.** 2011. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health : an environmental point prevalence study. *Lancet Infect Dis* **11**:355–62.
69. **Livermore DM, Walsh TR, Toleman M, Woodford N.** 2011. Balkan NDM-1 : escape or transplant? *Lancet Infect Dis* **11**:164.
70. **Nordmann P, Poirel L, Toleman MA, Walsh TR.** 2011. Does broad-spectrum β -lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria? *J Antimicrob Chemother* **66**:689–92.
71. **Berrazeg M, Diene SM, Medjahed L, Parola P, Drissi M, Raoult D, Rolain JM.** 2014. New Delhi Metallo- β -lactamase around the world : An eReview using Google Maps. *Euro Surveill* **19**:pii:20809.
72. **Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM.** 1999. Cloning and characterization of *bla*VIM, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* **43**:1584–90.
73. **Cornaglia G, Mazzariol A, Lauretti L, Rossolini GM, Fontana R.** 2000. Hospital outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1, a novel transferable metallo- β -lactamase. *Clin Infect Dis* **31**:1119–25.
74. **Riccio ML, Pallecchi L, Docquier JD, Cresti S, Catania MR, Pagani L, Lagatolla C, Cornaglia G, Fontana R, Rossolini GM.** 2005. Clonal relatedness and conserved integron structures in epidemiologically unrelated *Pseudomonas aeruginosa* strains producing the VIM-1 metallo- β -lactamase from different Italian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:104–10.
75. **Ikonomidis A, Tokatlidou D, Kristo I, Sofianou D, Tsakris A, Mantzana P, Pournaras S, Maniatis AN.** 2005. Outbreaks in distinct regions due to a single *Klebsiella pneumoniae* clone carrying a *bla*VIM-1 metallo- β -lactamase gene. *J Clin Microbiol* **43**:5344–47.
76. **Vatopoulos A.** 2008. High rates of metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece--a review of the current evidence. *Euro Surveill* **16**:pii:8023.
77. **Galani I, Souli M, Koratzanis E, Koratzanis G, Chrysosouli Z, Giamarellou H.** 2007. Emerging bacterial pathogens: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* and *Proteus mirabilis* clinical isolates harbouring the same transferable plasmid coding for metallo- β -lactamase VIM-1 in Greece. *J Antimicrob Chemother* **59**:578–9.
78. **Miriagou V, Douzinas EE, Papagiannitsis CC, Piperaki E, Legakis NJ, Tzouvelekis LS.** 2008. Emergence of *Serratia liquefaciens* and *Klebsiella oxytoca* with metallo- β -lactamase-encoding IncW plasmids: further spread of the *bla*VIM-1-carrying integron In-e541. *Int J Antimicrob Agents* **32**:540–1.
79. **Tsakris A, Ikonmidis A, Spanakis N, Poulou A, Pournaras S.** 2007. Characterization of In3Mor, a new integron carrying VIM-1 metallo- β -lactamase and *satI* gene, from *Morganella morganii*. *J Antimicrob Chemother* **59**:739–41.
80. **Tsakris A, Pournaras S, Woodford N, Palepou MI, Babini GS, Douboyas J.** 2000. Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. *J Clin Microbiol* **38**:1290–92.
81. **Ikonomidis A, Ntokou E, Maniatis AN, Tsakris A, Pournaras S.** 2008. Hidden VIM-1 metallo- β -lactamase phenotypes among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J Clin Microbiol* **46**:346–9.
82. **Giakkoupi P, Pappa O, Polemis M, Vatopoulos A, Miriagou V, Zioga A, Papagiannitsis CC, Tzouvelekis LS.** 2009. Emerging *Klebsiella pneumoniae* isolates coproducing KPC-2 and VIM-1 carbapenemases. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:4048–50.
83. **Zioga A, Miriagou V, Tzelepi E, Douzinas E, Tsakiri M, Legakis NJ, Daikos GL, Tzouvelekis LS.** 2010. The ongoing challenge of acquired carbapenemases: a hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* simultaneously producing VIM-1 and KPC-2. *Int J Antimicrob Agents* **36**:190–1.
84. **Castanheira M, Sader HS, Deshpande LM, Fritsche TR, Jones RN.** 2008. Antimicrobial activities of tigecycline and other broad-spectrum antimicrobials tested against serine carbapenemase- and metallo- β -lactamase-producing

Enterobacteriaceae: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Antimicrob Agents Chemother **52**:570–3.

85. **Tato M, Coque TM, Ruíz-Garbajosa P, Pintado V, Cobo J, Sader HS, Jones RN, Baquero F, Cantón R.** 2007. Complex clonal and plasmid epidemiology in the first outbreak of *Enterobacteriaceae* infection involving VIM-1 metallo- β -lactamase in Spain: toward endemicity? Clin Infect Dis **45**:1171–8.
86. **Heller I, Grif K, Orth D.** 2012. Emergence of VIM-1-carbapenemase-producing *Enterobacter cloacae* in Tyrol, Austria. J Med Microbiol **61**:567–71.
87. **Zarfel G, Hoenigl M, Würstl B, Leitner E, Salzer HJ, Valentin T, Posch J, Krause R, Grisold AJ.** 2011. Emergence of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in Austria, 2001 – 2010. Clin Microbiol Infect **17**:E5–8.
88. **Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H, Yoshimura F, Kato N.** 1994. Molecular characterization of an enterobacterial metallo- β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. Antimicrob Agents Chemother **38**:71–8.
89. **Walther-Rasmussen J, Hoiby N.** 2006. OXA-type carbapenemases. J Antimicrob Chemother **57**:373–83.
90. **Poirel L, Naas T, Nordmann P.** 2010. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother **54**:24–38.
91. **Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P.** 2004. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother **48**:15–22.
92. **Potron A, Poirel L, Rondinaud E, Nordmann P.** 2013. Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* over a 11-year period, 2001 to 2011.
93. **Castanheira M, Deshpande LM, Mathai D, Bell JM, Jones RN, Mendes RE.** 2011. Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing *Enterobacteriaceae* in Indian hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007. Antimicrob Agents Chemother **55**:1274–8.
94. **Potron A, Nordmann P, Poirel L.** 2013. Characterization of OXA-204, a carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother **57**:633–6.
95. **Potron A, Rondinaud E, Poirel L, Belmonte O, Boyer S, Camiade S, Nordmann P.** 2013. Genetic and biochemical characterisation of OXA-232, a carbapenem-hydrolysing class D β -lactamase from *Enterobacteriaceae*. Int J Antimicrob Agents **41**:325–9.
96. **Poirel L, Castanheira M, Carrër A, Rodriguez CP, Jones RN, Smayevsky J, Nordmann P.** 2011. OXA-163, an OXA-48-related class D β -lactamase with extended activity toward expanded-spectrum cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother **55**:2546–51.
97. **Gomez S, Pasteran F, Faccone D, Bettiol M, Veliz O, De Belder D, Rapoport M, Gatti B, Petroni A, Corso A.** 2013. Inpatient emergence of OXA-247: a novel carbapenemase found in a patient previously infected with OXA-163-producing *Klebsiella pneumoniae*. Clin Microbiol Infect **19**:E233–5.
98. **Abdelaziz MO, Bonura C, Aleo A, El-Domany RA, Fasciana T, Mammina C.** 2012. OXA-163-producing *Klebsiella pneumoniae* in Cairo, Egypt, in 2009 and 2010. J Clin Microbiol **50**:2489–91.
99. **Kotra LP, Haddad J, Mobashery S.** 2000. Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. Antimicrob Agents Chemother **44**:3249–56.
100. **Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH.** 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. Microbiol Rev **57**:138–163.
101. **Drieux L, Brossier F, Duquesnoy O, Aubry A, Robert J, Sougakoff W, Lecso-Bornet M, Jarlier V.** 2009. Increase in hospital-acquired bloodstream infections caused by extended spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in a large French teaching hospital. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **28**:491–8.
102. **Haldorsen BC, Simonsen GS, Sundsfjord A, Samuelsen O, Norwegian Study Group on Aminoglycoside Resistance.** 2014. Increased prevalence of aminoglycoside resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Norway is associated with the acquisition of AAC(3)-II and AAC(6')-Ib. Diagn Microbiol Infect Dis **78**:66–9.
103. **Wang M, Tran JH, Jacoby GA, Zhang Y, Wang F, Hooper DC.** 2003. Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. Antimicrob Agents Chemother **47**:2242–8.
104. **Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, Bush K, Hooper DC.** 2006. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. Nat Med **12**:83–8.

105. **Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A.** 2009. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev* **22**:664–89.
106. **Ferjani S, Saidani M, Amine FS, Boutiba-Ben Boubaker I.** 2015. Prevalence and characterization of plasmid-mediated quinolone resistance genes in extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in a Tunisian hospital. *Microb Drug Resist* **21**:158–66.
107. **Ruiz E, Sáenz Y, Zarazaga M, Rocha-Gracia R, Martínez-Martínez L, Arlet G, Torres C.** 2012. *qnr*, *aac(6')-Ib-cr* and *qepA* genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp.: genetic environments and plasmid and chromosomal location. *J Antimicrob Chemother* **67**:886–97.
108. **Murray IA, Shaw W V.** 1997. O-Acetyltransferases for chloramphenicol and other natural products. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:1–6.
109. **Hooper DC.** 2001. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg Infect Dis* **7**:337–341.
110. **Maxwell A.** 1997. DNA gyrase as a drug target. *Trends Microbiol* **5**:102–9.
111. **Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA.** 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* **351**:797–9.
112. **Tran JH, Jacoby GA.** 2002. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:5638–42.
113. **Jacoby GA, Strahilevitz J, Hooper DC.** 2014. Plasmid-mediated quinolone resistance. *Microbiol Spectr* **2**:1–42.
114. **Wang M, Sahm DF, Jacoby GA, Zhang Y, Hooper DC.** 2004. Activities of newer quinolones against *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* containing the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnr*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:1400–1.
115. **Wang M, Sahm DF, Jacoby GA, Hooper DC.** 2004. Emerging plasmid-mediated quinolone resistance associated with the *qnr* gene in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:1295–9.
116. **Chopra I, Roberts M.** 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**:232–60.
117. **Galimand M, Courvalin P, Lambert T.** 2003. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:2565–71.
118. **Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Yagi T, Kato H, Arakawa Y.** 2003. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet* **362**:1888–93.
119. **Mc Gann P, Chahine S, Okafor D, Ong AC, Maybank R, Kwak YI, Wilson K, Zapor M, Lesho E, Hinkle M.** 2015. Detecting 16S rRNA methyltransferases in *Enterobacteriaceae* using arbekacin. *J Clin Microbiol*:pii: JCM.02642–15.
120. **Bakour S, Touati A, Bachiri T, Sahli F, Tiouit D, Naim M, Azouaou M, Rolain JM.** 2014. First report of 16S rRNA methylase ArmA-producing *Acinetobacter baumannii* and rapid spread of metallo- β -lactamase NDM-1 in Algerian hospitals. *J Infect Chemother* **20**:696–701.
121. **Rahman M, Prasad KN, Pathak A, Pati BK, Singh A, Ovejero CM, Ahmad S, Gonzalez-Zorn B.** 2015. RmtC and RmtF 16S rRNA methyltransferase in NDM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Emerg Infect Dis* **21**:2059–62.
122. **Berçot B, Poirel L, Nordmann P.** 2011. Updated multiplex polymerase chain reaction for detection of 16S rRNA methylases : high prevalence among NDM-1 producers. *Diagn Microbiol Infect Dis* **71**:442–5.
123. **Huovinen P, Sundström L, Swedberg G, Sköld O.** 1995. Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **39**:279–89.
124. **Schito GC, Naber KG, Botto H, Palou J, Mazzei T, Gualco L, Marchese A.** 2009. The ARESC study: an international survey on the antimicrobial resistance of pathogens involved in uncomplicated urinary tract infections. *Int J Antimicrob Agents* **34**:407–13.
125. **Caillon J, Gueudet T, Mérens A.** Enquête Transville 2012 ONERBA, Communication orale. RICAI 2013 (Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse), Paris, France.
126. **Piddock LJ V.** 2006. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev* **19**:382–402.
127. **Escherich T.** 1885. Die darmbakterien des neugeborenen und säuglings. *Fortschr Med* **3**:515–522, 547–554.
128. **Castellani A, Chalmers A.** 1919. Manual of tropical medicine. 3rd ed New York William, Wood Co.

129. **Judicial Commission of the International Committee on Bacteriological Nomenclature.** 1958. Conservation of the family name *Enterobacteriaceae*, of the name of the type genus, and the designation of the type species. Intl Bull Bacteriol Nom Taxon **8**:73–4.
130. **Brenner DJ, Davis BR, Steigerwalt AG, Riddle CF, McWhorter AC, Allen SD, Farmer JJ, Saitoh Y, Fanning GR.** 1982. Atypical biogroups of *Escherichia coli* found in clinical specimens and description of *Escherichia hermannii* sp. nov. J Clin Microbiol **15**:703–713.
131. **Brenner DJ, McWhorter AC, Knutson JK, Steigerwalt AG.** 1982. *Escherichia vulneris*: a new species of *Enterobacteriaceae* associated with human wounds. J Clin Microbiol **15**:1133–1140.
132. **Farmer JJ, Fanning GR, Davis BR, O'Hara CM, Riddle C, Hickman-Brenner FW, Asbury MA, Lowery VA, Brenner DJ.** 1985. *Escherichia fergusonii* and *Enterobacter taylorae*, two new species of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. J Clin Microbiol **21**:77–81.
133. **Huys G, Cnockaert M, Janda JM, Swings J.** 2003. *Escherichia albertii* sp. nov., a diarrhoeagenic species isolated from stool specimens of Bangladeshi children. Int J Syst Evol Microbiol **53**:807–810.
134. **Liu S, Jin D, Lan R, Wang Y, Meng Q, Dai H, Lu S, Hu S, Xu J.** 2015. *Escherichia marmotae* sp. nov., isolated from faeces of *Marmota himalayana*. Int J Syst Evol Microbiol **65**:2130–4.
135. **Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL.** 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol **2**:123–140.
136. **Gordon DM, Cowling A.** 2003. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: Host and geographic effects. Microbiology **149**:3575–3586.
137. **Freter R, Brickner H, Fekete J, Vickerman MM, Carey KE, Carey E.** 1983. Survival and implantation of *Escherichia coli* in the intestinal tract. Infect Immun **39**:686–703.
138. **Berg RD.** 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. Trends Microbiol **4**:430–435.
139. **Poulsen LK, Lan F, Kristensen CS, Hobolth P.** 1994. Spatial distribution of *Escherichia coli* in the mouse large intestine inferred from rRNA in situ hybridization. Infect Immun **62**:5191–5194.
140. **Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E.** 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol **8**:207–217.
141. **Savageau M.** 1983. *Escherichia coli* habitats, cell types, and molecular mechanisms of gene control. Am Nat **122**:732–744.
142. **Power ML, Littlefield-Wyer J, Gordon DM, Veal DA, Slade MB.** 2005. Phenotypic and genotypic characterization of encapsulated *Escherichia coli* isolated from blooms in two Australian lakes. Environ Microbiol **7**:631–640.
143. **Croxen MA, Finlay BB.** 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. Nat Rev Microbiol **8**:26–38.
144. **Clarke SC, Haigh RD, Freestone PPE, Williams PH.** 2003. Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. Clin Microbiol Rev **16**:365–378.
145. **Russo TA, Johnson JR.** 2000. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. J Infect Dis **181**:1753–1754.
146. **Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA.** 2008. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. Exp Mol Pathol **85**:11–19.
147. **Schmidt H, Hensel M.** 2004. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. Clin Microbiol Rev **17**:14–56.
148. **Dozois CM, Curtiss R.** 1999. Pathogenic diversity of *Escherichia coli* and the emergence of “exotic” islands in the gene stream. Vet Res **30**:157–179.
149. **Lillington J, Geibel S, Waksman G.** 2014. Biogenesis and adhesion of type 1 and P *pili*. Biochim Biophys Acta - Gen Subj **1840**:2783–2793.
150. **Mulvey MA, Lopez-Boado YS, Wilson CL, Roth R, Parks WC, Heuser J, Hultgren SJ.** 1998. Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. Science (80-) **282**:1494–1497.
151. **Hannan TJ, Totsika M, Mansfield KJ, Moore KH, Mark A, Hultgren SJ.** 2013. Host-pathogen checkpoints and population bottlenecks in persistent and intracellular uropathogenic *E. coli* bladder infection. FEMS Microbiol Rev **36**:616–648.

152. **Hunstad DA, Justice SS.** 2010. Intracellular lifestyles and immune evasion strategies of uropathogenic *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol* **64**:203–221.
153. **Mysorekar IU, Hultgren SJ.** 2006. Mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli* persistence and eradication from the urinary tract. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:14170–14175.
154. **Chassin C, Vimont S, Cluzeaud F, Bens M, Goujon J-M, Fernandez B, Hertig A, Rondeau E, Arlet G, Hornef MW, Vandewalle A.** 2008. TLR4 facilitates translocation of bacteria across renal collecting duct cells. *J Am Soc Nephrol* **19**:2364–2374.
155. **Xie Y, Kim KJ, Kim KS.** 2004. Current concepts on *Escherichia coli* K1 translocation of the blood-brain barrier. *FEMS Immunol Med Microbiol* **42**:271–279.
156. **Welch RA, Burland V, Plunkett G, Redford P, Roesch P, Rasko D, Buckles EL, Liou SR, Boutin A, Hackett J, Stroud D, Mayhew GF, Rose DJ, Zhou S, Schwartz DC, Perna NT, Mobley HLT, Donnenberg MS, Blattner FR.** 2002. Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:17020–17024.
157. **Ahmed N, Dobrindt U, Hacker J, Hasnain SE.** 2008. Genomic fluidity and pathogenic bacteria: application in diagnostics, epidemiology and intervention. *Nat Rev Microbiol* **6**:387–94.
158. **Lloyd AL, Henderson TA, Vigil PD, Mobley HLT.** 2009. Genomic islands of uropathogenic *Escherichia coli* contribute to virulence. *J Bacteriol* **191**:3469–3481.
159. **Kauffman F.** 1947. The serology of the coli group. *J Immunol* **57**:71–100.
160. **Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Morita-Ishihara T, Scheutz F, Ohnishi M.** 2015. *Escherichia coli* O-genotyping PCR; a comprehensive and practical platform for molecular O-serogrouping. *J Clin Microbiol* **53**:JCM.00321–15.
161. **Orskov F, Orskov I.** 1992. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Can J Microbiol* **38**:699–704.
162. **Johnson JR, Nicolas Chanoine MH, Debroy C, Castanheira M, Robicsek A, Hansen G, Weissman S, Urban C, Platell J, Trott D, Zhanel G, Clabots C, Johnston BD, Kuskowski M, Master Investigators.** 2012. Comparison of *Escherichia coli* ST131 pulsotypes, by epidemiologic traits, 1967-2009. *Emerg Infect Dis* **18**:598–607.
163. **Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, Sá-Leão R, van Dijk J, Laurent F, Grundmann H, Friedrich AW, ESCMID Study Group of Epidemiological Markers (ESGEM).** 2013. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill* **18**:20380.
164. **Tenover FC, Arbeit RD, Goering R V, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B.** 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis : criteria for bacterial strain typing . *J Clin Microbiol* **33**:2233–2239.
165. **Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E.** 2000. Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Appl Environ Microbiol* **66**:4555–4558.
166. **Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM.** 2013. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep* **5**:58–65.
167. **Enright MC, Spratt BG.** 1999. Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol* **7**:482–487.
168. **Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler LH, Karch H, Reeves PR, Maiden MCJ, Ochman H, Achtman M.** 2006. Sex and virulence in *Escherichia coli*: An evolutionary perspective. *Mol Microbiol* **60**:1136–1151.
169. **Jaureguy F, Landraud L, Passet V, Diancourt L, Frapy E, Guigon G, Carbonnelle E, Lortholary O, Clermont O, Denamur E, Picard B, Nassif X, Brisse S.** 2008. Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics* **9**:560.
170. **Köhler CD, Dobrindt U.** 2011. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? *Int J Med Microbiol* **301**:642–647.
171. **Riley LW.** 2014. Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infect* **20**:380–390.
172. **Johnson JR, O'Bryan TT, Delavari P, Kuskowski M, Stapleton A, Carlino U, Russo T.** 2001. Clonal relationships and extended virulence genotypes among *Escherichia coli* isolates from women with a first or recurrent episode of cystitis. *J Infect Dis* **183**:1508–1517.
173. **Tartof SY, Solberg OD, Riley LW.** 2007. Genotypic analyses of uropathogenic *Escherichia coli* based on *fimH* single nucleotide polymorphisms (SNPs). *J Med Microbiol* **56**:1363–1369.

174. **Weissman SJ, Chattopadhyay S, Aprikian P, Obata-Yasuoka M, Yarova-Yarovaya Y, Stapleton A, Ba-Thein W, Dykhuizen D, Johnson JR, Sokurenko E V.** 2006. Clonal analysis reveals high rate of structural mutations in fimbrial adhesins of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **59**:975–988.
175. **Dias RCS, Moreira BM, Riley LW.** 2010. Use of *fimH* single-nucleotide polymorphisms for strain typing of clinical isolates of *Escherichia coli* for epidemiologic investigation. *J Clin Microbiol* **48**:483–488.
176. **Weissman SJ, Johnson JR, Tchesnokova V, Billig M, Dykhuizen D, Riddell K, Rogers P, Qin X, Butler-Wu S, Cookson BT, Fang FC, Scholes D, Chattopadhyay S, Sokurenko E.** 2012. High-resolution two-locus clonal typing of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **78**:1353–1360.
177. **Vernikos G, Medini D, Riley DR, Tettelin H.** 2015. Ten years of pan-genome analyses. *Curr Opin Microbiol* **23**:148–154.
178. **Land M, Hauser L, Jun S-R, Nookaew I, Leuze MR, Ahn T-H, Karpinets T, Lund O, Kora G, Wassenaar T, Poudel S, Ussery DW.** 2015. Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. *Funct Integr Genomics* **15**:141–161.
179. **Nicolas-Chanoine M-H, Bertrand X, Madec J-Y.** 2014. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clin Microbiol Rev* **27**:543–74.
180. **Le Gall T, Clermont O, Gouriou S, Picard B, Nassif X, Denamur E, Tenaillon O.** 2007. Extraintestinal virulence is a coincidental by-product of commensalism in B2 phylogenetic group *Escherichia coli* strains. *Mol Biol Evol* **24**:2373–2384.
181. **Clermont O, Dhanji H, Upton M, Gibreel T, Fox A, Boyd D, Mulvey MR, Nordmann P, Ruppé E, Sarthou JL, Frank T, Vimont S, Arlet G, Branger C, Woodford N, Denamur E.** 2009. Rapid detection of the O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* encompassing the CTX-M-15-producing strains. *J Antimicrob Chemother* **64**:274–277.
182. **Olesen B, Hansen DS, Nilsson F, Frimodt-Møller J, Leihof RF, Struve C, Scheutz F, Johnston B, Krogfelt KA, Johnson JR.** 2013. Prevalence and characteristics of the epidemic multiresistant *Escherichia coli* ST131 clonal group among extended-spectrum β -lactamase-producing *E. coli* isolates in Copenhagen, Denmark. *J Clin Microbiol* **51**:1779–1785.
183. **Dahbi G, Mora A, López C, Alonso MP, Mamani R, Marzoa J, Coira A, García-Garrote F, Pita JM, Velasco D, Herrera A, Viso S, Blanco JE, Blanco M, Blanco J.** 2013. Emergence of new variants of ST131 clonal group among extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases. *Int J Antimicrob Agents* **42**:347–351.
184. **Blanc V, Leflon-Guibout V, Blanco J, Haenni M, Madec J-Y, Raignon G, Bruno P, Mora A, Lopez C, Dahbi G, Dunais B, Anastay M, Branger C, Moreau R, Pradier C, Nicolas-Chanoine M-H.** 2014. Prevalence of day-care centre children (France) with faecal CTX-M-producing *Escherichia coli* comprising O25b:H4 and O16:H5 ST131 strains. *J Antimicrob Chemother* **69**:1231–1237.
185. **Matsumura Y, Yamamoto M, Nagao M, Hotta G, Matsushima A, Ito Y, Takakura S, Ichiyama S.** 2012. Emergence and spread of B2-ST131-O25b, B2-ST131-O16 and D-ST405 clonal groups among extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan. *J Antimicrob Chemother* **67**:2612–2620.
186. **Johnson JR, Clermont O, Johnston B, Clabots C, Tchesnokova V, Sokurenko E, Junka AF, Maczynska B, Denamur E.** 2014. Rapid and specific detection, molecular epidemiology, and experimental virulence of the O16 subgroup within *Escherichia coli* sequence type 131. *J Clin Microbiol* **52**:1358–1365.
187. **Habeeb MA, Haque A, Iversen A, Giske C.** 2014. Occurrence of virulence genes, 16S rRNA methylases, and plasmid-mediated quinolone resistance genes in CTX-M-producing *Escherichia coli* from Pakistan. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **33**:399–409.
188. **Platell JL, Cobbold RN, Johnson JR, Heisig A, Heisig P, Clabots C, Kuskowski MA, Trott DJ.** 2011. Commonality among fluoroquinolone-resistant sequence type ST131 extraintestinal *Escherichia coli* isolates from humans and companion animals in Australia. *Antimicrob Agents Chemother* **55**:3782–3787.
189. **Van der Bij AK, Peirano G, Pitondo-Silva A, Pitout JDD.** 2012. The presence of genes encoding for different virulence factors in clonally related *Escherichia coli* that produce CTX-Ms. *Diagn Microbiol Infect Dis* **72**:297–302.
190. **Blanco J, Mora A, Mamani R, López C, Blanco M, Dahbi G, Herrera A, Marzoa J, Fernández V, De La Cruz F, Martínez-Martínez L, Alonso MP, Nicolas-Chanoine MH, Johnson JR, Johnston B, López-Cerero L, Pascual Á, Rodríguez-Baño J.** 2013. Four main virotypes among extended-spectrum- β -lactamase-producing isolates of *Escherichia coli* O25b:H4-B2-ST131: Bacterial, epidemiological, and clinical characteristics. *J Clin Microbiol* **51**:3358–3367.

191. **Johnson JR, Murray AC, Gajewski A, Sullivan M, Snippes P, Kuskowski MA, Smith KE.** 2003. Isolation and molecular characterization of nalidixic acid-resistant Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* from retail chicken products. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:2161–2168.
192. **Mora A, Dahbi G, López C, Mamani R, Marzoa J, Dion S, Picard B, Blanco M, Alonso MP, Denamur E, Blanco J.** 2014. Virulence patterns in a murine sepsis model of ST131 *Escherichia coli* clinical isolates belonging to serotypes O25b:H4 and O16:H5 are associated to specific virotypes. *PLoS One* **9**.
193. **Johnson JR, Tchesnokova V, Johnston B, Clabots C, Roberts PL, Billig M, Riddell K, Rogers P, Qin X, Butler-Wu S, Price LB, Aziz M, Nicolas-Chanoine MH, Debroy C, Robicsek A, Hansen G, Urban C, Platell J, Trott DJ, Zhanel G, Weissman SJ, Cookson BT, Fang FC, Limaye AP, Scholes D, Chattopadhyay S, Hooper DC, Sokurenko E V.** 2013. Abrupt emergence of a single dominant multidrug-resistant strain of *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **207**:919–928.
194. **Clermont O, Johnson JR, Menard M, Denamur E.** 2007. Determination of *Escherichia coli* O types by allele-specific polymerase chain reaction: application to the O types involved in human septicemia. *Diagn Microbiol Infect Dis* **57**:129–136.
195. **Johnson JR, Menard M, Johnston B, Kuskowski MA, Nichol K, Zhanel GG.** 2009. Epidemic clonal groups of *Escherichia coli* as a cause of antimicrobial-resistant urinary tract infections in Canada, 2002 to 2004. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:2733–2739.
196. **Banerjee R, Johnston B, Lohse C, Chattopadhyay S, Tchesnokova V, Sokurenko E V., Johnson JR.** 2013. The clonal distribution and diversity of extraintestinal *Escherichia coli* isolates vary according to patient characteristics. *Antimicrob Agents Chemother* **57**:5912–5917.
197. **Tchesnokova V, Billig M, Chattopadhyay S, Linardopoulou E, Aprikian P, Roberts PL, Skrivankova V, Johnston B, Gileva A, Igusheva I, Toland A, Riddell K, Rogers P, Qin X, Butler-Wu S, Cookson BT, Fang FC, Kahl B, Price LB, Weissman SJ, Limaye A, Scholes D, Johnson JR, Sokurenko E V.** 2013. Predictive diagnostics for *Escherichia coli* infections based on the clonal association of antimicrobial resistance and clinical outcome. *J Clin Microbiol* **51**:2991–2999.
198. **Lartigue M-F.** 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for bacterial strain characterization. *Infect Genet Evol* **13**:230–5.
199. **Nakamura A, Komatsu M, Kondo A, Ohno Y, Kohno H, Nakamura F, Matsuo S, Ohnuma K, Hatano N, Kawano S.** 2015. Rapid detection of B2-ST131 clonal group of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption ionization–time-of-flight mass spectrometry: discovery of a peculiar amino acid substitution in B2-ST131 clonal group. *Diagn Microbiol Infect Dis*.
200. **Lafolie J, Sauget M, Cabrollet N, Hocquet D, Bertrand X.** 2015. Detection of *Escherichia coli* sequence type 131 by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: implications for infection control policies? *J Hosp Infect* **90**:208–212.
201. **Matsumura Y, Yamamoto M, Nagao M, Tanaka M, Machida K, Ito Y, Takakura S, Ichiyama S.** 2014. Detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 and ST405 clonal groups by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* **52**:1034–1040.
202. **Novais Â, Sousa C, De Dios Caballero J, Fernandez-Olmos A, Lopes J, Ramos H, Coque TM, Cantón R, Peixe L.** 2014. MALDI-TOF mass spectrometry as a tool for the discrimination of high-risk *Escherichia coli* clones from phylogenetic groups B2 (ST131) and D (ST69, ST405, ST393). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **33**:1391–1399.
203. **Blanco M, Alonso MP, Nicolas-Chanoine M-H, Dahbi G, Mora A, Blanco JE, López C, Cortés P, Llagostera M, Leflon-Guibout V, Puentes B, Mamani R, Herrera A, Coira MA, García-Garrote F, Pita JM, Blanco J.** 2009. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases in Lugo (Spain): dissemination of clone O25b:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother* **63**:1135–41.
204. **Hrabák J, Empel J, Bergerová T, Fajfrlík K, Urbášková P, Kern-Zdanowicz I, Hryniewicz W, Gniadkowski M.** 2009. International clones of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* with extended-spectrum β -lactamases in a Czech Hospital. *J Clin Microbiol* **47**:3353–3357.
205. **Coelho A, Mora A, Mamani R, López C, González-López JJ, Larrosa MN, Quintero-Zarate JN, Dahbi G, Herrera A, Blanco JE, Blanco M, Alonso MP, Prats G, Blanco J.** 2011. Spread of *Escherichia coli* O25b:H4-B2-ST131 producing CTX-M-15 and SHV-12 with high virulence gene content in Barcelona (Spain). *J Antimicrob Chemother* **66**:517–526.
206. **Xu L, Shabir S, Bodah T, McMurray C, Hardy K, Hawkey P, Nye K.** 2011. Regional survey of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases among *Enterobacteriaceae* reveals marked heterogeneity in the distribution of the ST131 clone. *J Antimicrob Chemother* **66**:505–511.

207. **Brisse S, Diancourt L, Laouénan C, Vigan M, Caro V, Arlet G, Drieux L, Leflon-Guibout V, Mentré F, Jarlier V, Nicolas-Chanoine MH.** 2012. Phylogenetic distribution of CTX-M- and non-extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates: group B2 isolates, except clone ST131, rarely produce CTX-M enzymes. *J Clin Microbiol* **50**:2974–81.
208. **Seiffert SN, Hilty M, Kronenberg A, Droz S, Perreten V, Endimiani A.** 2013. Extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* in community, specialized outpatient clinic and hospital settings in Switzerland. *J Antimicrob Chemother* **68**:2249–2254.
209. **Doi Y, Park YS, Rivera JI, Adams-Haduch JM, Hingwe A, Sordillo EM, Lewis JS, Howard WJ, Johnson LE, Polsky B, Jorgensen JH, Richter SS, Shutt KA, Paterson DL.** 2013. Community-associated extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* infection in the United States. *Clin Infect Dis* **56**:641–648.
210. **Colpan A, Johnston B, Porter S, Clabots C, Anway R, Thao L, Kuskowski MA, Tchesnokova V, Sokurenko E V., Johnson JR, Allen BL, Baracco GJ, Bedimo R, Bessesen M, Bonomo RA, Brecher SM, Brown ST, Castellino L, Desai AS, Fernau F, Fisher M a., Fleckenstein J, Fleming CS, Fries NJ, Kan VL, Kauffman CA, Klutts S, Ohl M, Russo T, Swiatlo A, Swiatlo E.** 2013. *Escherichia coli* sequence type 131 (ST131) subclone H30 as an emergent multidrug-resistant pathogen among US Veterans. *Clin Infect Dis* **57**:1256–1265.
211. **Simner PJ, Zhanel GG, Pitout J, Tailor F, McCracken M, Mulvey MR, Lagacé-Wiens PRS, Adam HJ, Hoban DJ.** 2011. Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamase- and AmpC β -lactamase-producing *Escherichia coli*: Results of the CANWARD 2007-2009 study. *Diagn Microbiol Infect Dis* **69**:326–334.
212. **Yano H, Uemura M, Endo S, Kanamori H, Inomata S, Kakuta R, Ichimura S, Ogawa M, Shimojima M, Ishibashi N, Aoyagi T, Hatta M, Gu Y, Yamada M, Tokuda K, Kunishima H, Kitagawa M, Hirakata Y, Kaku M.** 2013. Molecular Characteristics of Extended-Spectrum β -Lactamases in Clinical Isolates from *Escherichia coli* at a Japanese Tertiary Hospital. *PLoS One* **8**:1–6.
213. **Hussain A, Ewers C, Nandanwar N, Guenther S, Jadhav S, Wieler LH, Ahmed N.** 2012. Multiresistant uropathogenic *Escherichia coli* from a region in India where urinary tract infections are endemic: Genotypic and phenotypic characteristics of sequence type 131 isolates of the CTX-M-15 extended-spectrum- β -lactamase-producing lineage. *Antimicrob Agents Chemother* **56**:6358–6365.
214. **Peirano G, Van Der Bij AK, Gregson DB, Pitout JDD.** 2012. Molecular epidemiology over an 11-year period (2000 to 2010) of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* causing bacteremia in a centralized Canadian region. *J Clin Microbiol* **50**:294–299.
215. **Blanco J, Mora A, Mamani R, López C, Blanco M, Dahbi G, Herrera A, Blanco JE, Alonso MP, García-Garrote F, Chaves F, Orellana MA, Martínez-Martínez L, Calvo J, Prats G, Larrosa MN, Lez-López JJG, López-Cerero L, Rodríguez-Baño J, Pascual A.** 2011. National survey of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections reveals the spread of drug-resistant clonal groups O25b:H4-B2-ST131, O15:H1-D-ST393 and CGA-D-ST69 with high virulence gene content in Spain. *J Antimicrob Chemother* **66**:2011–2021.
216. **Banerjee R, Strahilevitz J, Johnson JR, Nagwekar PP, Schora DM, Shevrin I, Du H, Peterson LR, Robicsek A.** 2013. Predictors and molecular epidemiology of community-onset extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* infection in a Midwestern community. *Infect Control Hosp Epidemiol* **34**:947–53.
217. **Banerjee R, Johnson JR.** 2014. A new clone sweeps clean: The enigmatic emergence of *Escherichia coli* sequence type 131. *Antimicrob Agents Chemother* **58**:4997–5004.
218. **Nicolas-chanoine MH, Gruson C, Bialek-Davenet S, Bertrand X, Thomas-Jean F, Bert F, Moyat M, Meiller E, Marcon E, Danchin N, Noussair L, Moreau R, Leflon-Guibout V.** 2013. 10-fold increase (2006-11) in the rate of healthy subjects with extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* faecal carriage in a parisian check-up centre. *J Antimicrob Chemother* **68**:562–568.
219. **Birgy A, Mariani-Kurkdjian P, Bidet P, Doit C, Genel N, Courroux C, Arlet G, Bingen E.** 2013. Characterization of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains involved in maternal-fetal colonization: Prevalence of *E. coli* ST131. *J Clin Microbiol* **51**:1727–1732.
220. **Arvand M, Moser V, Pfeifer Y.** 2013. Prevalence of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* and spread of the epidemic clonal lineage ST131 in nursing homes in Hesse, Germany. *J Antimicrob Chemother* **68**:2686–2688.
221. **Kudinha T, Johnson J, Andrew SD, Kong F, Anderson P, Gilbert GL.** 2013. Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from children with urinary tract infection and from healthy carriers. *Pediatr Infect Dis J* **32**:543–8.
222. **Kudinha T, Johnson JR, Andrew SD, Kong F, Anderson P, Gilbert GL.** 2013. Distribution of phylogenetic groups, sequence type ST131, and virulence-associated traits among *Escherichia coli* isolates from men with pyelonephritis or cystitis and healthy controls. *Clin Microbiol Infect* **19**:E173–E180.

223. **Kudinha T, Johnson JR, Andrew SD, Kong F, Anderson P, Gilbert GL.** 2013. *Escherichia coli* sequence type 131 as a prominent cause of antibiotic resistance among urinary *Escherichia coli* isolates from reproductive-age women. *J Clin Microbiol* **51**:3270–3276.
224. **Leflon-Guibout V, Blanco J, Amaqdouf K, Mora A, Guize L, Nicolas-Chanoine MH.** 2008. Absence of CTX-M enzymes but high prevalence of clones, including clone ST131, among fecal *Escherichia coli* isolates from healthy subjects living in the area of Paris, France. *J Clin Microbiol* **46**:3900–3905.
225. **Pomba C, Da Fonseca JD, Baptista BC, Correia JD, Martínez-Martínez L.** 2009. Detection of the pandemic O25-ST131 human virulent *Escherichia coli* CTX-M-15-producing clone harboring the *qnrB2* and *aac(6')-Ib-cr* genes in a dog. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:327–328.
226. **Johnson JR, Miller S, Johnston B, Clabots C, DeRoy C.** 2009. Sharing of *Escherichia coli* sequence type ST131 and other multidrug-resistant and urovirulent *E. coli* strains among dogs and cats within a household. *J Clin Microbiol* **47**:3721–3725.
227. **Ewers C, Grobbel M, Stamm I, Kopp PA, Diehl I, Semmler T, Fruth A, Beutlich J, Guerra B, Wieler LH, Guenther S.** 2010. Emergence of human pandemic O25:H4-ST131 CTX-M-15 extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* among companion animals. *J Antimicrob Chemother* **65**:651–660.
228. **Platell JL, Cobbold RN, Johnson JR, Trott DJ.** 2010. Clonal group distribution of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* among humans and companion animals in Australia. *J Antimicrob Chemother* **65**:1936–1938.
229. **Platell JL, Johnson JR, Cobbold RN, Trott DJ.** 2011. Multidrug-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* of sequence type ST131 in animals and foods. *Vet Microbiol* **153**:99–108.
230. **Department of Health and Human Services.** 2010. NARMS Retail Meat Annual Report. Food and Drug Administration. Available at: <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/NationalAntimicrobialResistanceMonitoringSystem/ucm293578.htm>.
231. **Randall LP, Clouting C, Horton RA, Coldham NG, Wu G, Clifton-Hadley FA, Davies RH, Teale CJ.** 2011. Prevalence of *Escherichia coli* carrying extended-spectrum β -lactamases (CTX-M and TEM-52) from broiler chickens and turkeys in Great Britain between 2006 and 2009. *J Antimicrob Chemother* **66**:86–95.
232. **Giufre M, Graziani C, Accogli M, Luzzi I, Busani L, Cerquetti M.** 2012. *Escherichia coli* of human and avian origin: Detection of clonal groups associated with fluoroquinolone and multidrug resistance in Italy. *J Antimicrob Chemother* **67**:860–867.
233. **Cortes P, Blanc V, Mora A, Dahbi G, Blanco JE, Blanco M, Lopez C, Andreu A, Navarro F, Alonso MP, Bou G, Blanco J, Llagostera M.** 2010. Isolation and characterization of potentially pathogenic antimicrobial-resistant *Escherichia coli* strains from chicken and pig farms in Spain. *Appl Environ Microbiol* **76**:2799–2805.
234. **Trobos M, Christensen H, Sunde M, Nordentoft S, Agersø Y, Simonsen GS, Hammerum AM, Olsen JE.** 2009. Characterization of sulphonamide-resistant *Escherichia coli* using comparison of *sul2* gene sequences and multilocus sequence typing. *Microbiology* **155**:831–836.
235. **Guenther S, Ewers C, Wieler LH.** 2011. Extended-spectrum β -lactamases producing *E. coli* in wildlife, yet another form of environmental pollution? *Front Microbiol* **2**:1–13.
236. **Hernandez J, Bonnedahl J, Eliasson I, Wallensten A, Comstedt P, Johansson A, Granholm S, Melhus Å, Olsen B, Drobní M.** 2010. Globally disseminated human pathogenic *Escherichia coli* of O25b-ST131 clone, harbouring *bla*CTX-M-15, found in Glaucous-winged gull at remote Commander Islands, Russia. *Environ Microbiol Rep* **2**:329–332.
237. **Simões RR, Poirel L, Da Costa PM, Nordmann P.** 2010. Seagulls and beaches as reservoirs for multidrug-resistant *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* **16**:110–112.
238. **Tausova D, Dolejska M, Cizek A, Hanusova L, Hrusakova J, Svoboda O, Camlik G, Literak I.** 2012. *Escherichia coli* with extended-spectrum β -lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in great cormorants and mallards in central europe. *J Antimicrob Chemother* **67**:1103–1107.
239. **Báez J, Hernández-García M, Guamparito C, Díaz S, Olave A, Guerrero K, Cantón R, Baquero F, Gahona J, Valenzuela N, Del Campo R, Silva J.** 2015. Molecular characterization and genetic diversity of ESBL-producing *Escherichia coli* colonizing the migratory Franklin's gulls (*Leucophaeus pipixcan*) in Antofagasta, North of Chile. *Microb Drug Resist* **21**:111–6.
240. **Guenther S, Grobbel M, Beutlich J, Guerra B, Ulrich RG, Wieler LH, Ewers C.** 2010. Detection of pandemic B2-O25-ST131 *Escherichia coli* harbouring the CTX-M-9 extended-spectrum β -lactamase type in a feral urban brown rat (*Rattus norvegicus*). *J Antimicrob Chemother* **65**:582–584.

241. **Ho P, Lo W, Lai E, Law P, Leung S, Wang Y, Chow K.** 2015. Clonal diversity of CTX-M-producing, multidrug-resistant *Escherichia coli* from rodents. *J Med Microbiol* **64**:185–190.
242. **Brahmi S, Dunyach-Rémy C, Touati A, Lavigne J.** 2015. CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and the pandemic clone O25b-ST131 isolated from wild fish in Mediterranean Sea. *Clin Microbiol Infect* **21**:e18–20.
243. **Galvin S, Boyle F, Hickey P, Vellinga A, Morris D, Cormican M.** 2010. Enumeration and characterization of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* bacteria in effluent from municipal, hospital, and secondary treatment facility sources. *Appl Environ Microbiol* **76**:4772–4779.
244. **Mesa RJ, Blanc V, Blanch AR, Cortés P, González JJ, Lavilla S, Miró E, Muniesa M, Saco M, Tórtola MT, Mirelis B, Coll P, Llagostera M, Prats G, Navarro F.** 2006. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *J Antimicrob Chemother* **58**:211–215.
245. **Jakobsen L, Sandvang D, Hansen LH, Bagger-Skjøt L, Westh H, Jørgensen C, Hansen DS, Pedersen BM, Monnet DL, Frimodt-Møller N, Sørensen SJ, Hammerum AM.** 2008. Characterisation, dissemination and persistence of gentamicin resistant *Escherichia coli* from a Danish university hospital to the waste water environment. *Environ Int* **34**:108–115.
246. **Zarfel G, Galler H, Feierl G, Haas D, Kittinger C, Leitner E, Grisold a. J, Mascher F, Posch J, Pertschy B, Marth E, Reinthaler FF.** 2013. Comparison of extended-spectrum- β -lactamase (ESBL) carrying *Escherichia coli* from sewage sludge and human urinary tract infection. *Environ Pollut* **173**:192–199.
247. **Dhanji H, Murphy NM, Akhigbe C, Doumith M, Hope R, Livermore DM, Woodford N.** 2011. Isolation of fluoroquinolone-resistant O25b:H4-ST131 *Escherichia coli* with CTX-M-14 extended-spectrum β -lactamase from UK river water. *J Antimicrob Chemother* **66**:512–516.
248. **Colomer-Lluch M, Mora A, López C, Mamani R, Dahbi G, Marzoa J, Herrera A, Viso S, Blanco JE, Blanco M, Alonso MP, Jofre J, Muniesa M, Blanco J.** 2013. Detection of quinolone-resistant *Escherichia coli* isolates belonging to clonal groups O25B:H4-B2-ST131 and O25B:H4-D-ST69 in raw sewage and river water in Barcelona, Spain. *J Antimicrob Chemother* **68**:758–765.
249. **Vignaroli C, Luna G, Pasquaroli S, Di Cesare A, Petruzzella R, Paroncini P, Biavasco F.** 2013. Epidemic *Escherichia coli* ST131 and *Enterococcus faecium* ST17 in coastal marine sediments from an Italian beach. *Env Sci Technol* **47**:13772–80.
250. **Adams-Sapper S, Diep BA, Perdreau-Remington F, Riley LW.** 2013. Clonal composition and community clustering of drug-susceptible and -resistant *Escherichia coli* isolates from bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother* **57**:490–497.
251. **Gibreel TM, Dodgson AR, Cheesbrough J, Fox AJ, Bolton FJ, Upton M.** 2012. Population structure, virulence potential and antibiotic susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* from Northwest England. *J Antimicrob Chemother* **67**:346–356.
252. **López-Cerero L, Navarro MD, Bellido M, Martín-Peña A, Viñas L, Cisneros JM, Gómez-Langley SL, Sánchez-Monteseirín H, Morales I, Pascual A, Rodríguez-Baño J.** 2014. *Escherichia coli* belonging to the worldwide emerging epidemic clonal group O25b/ST131: Risk factors and clinical implications. *J Antimicrob Chemother* **69**:809–814.
253. **Assimakopoulos A, Johnston B, Clabots C, Johnson JR.** 2012. Post-prostate biopsy infection with *Escherichia coli* ST131 leading to epididymo-orchitis and meningitis caused by gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* **50**:4157–4159.
254. **Johnson J, Anderson J, Clabots C, Johnston B, Cooperstock M.** 2010. Within-household sharing of a fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* sequence type ST131 strain causing pediatric osteoarticular infection. *Pediatr Infect Dis J* **29**:473–5.
255. **Vigil KJ, Johnson JR, Johnston BD, Kontoyiannis DP, Mulanovich VE, Raad II, Dupont HL, Adachi JA.** 2010. *Escherichia coli* pyomyositis: an emerging infectious disease among patients with hematologic malignancies. *Clin Infect Dis* **50**:374–380.
256. **Berman H, Barberino MG, Moreira ED, Riley L, Reis JN.** 2014. Distribution of strain type and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates causing meningitis in a large urban setting in Brazil. *J Clin Microbiol* **52**:1418–1422.
257. **Alhashash F, Weston V, Diggle M, McNally A.** 2013. Multidrug-resistant *Escherichia coli* bacteremia. *Emerg Infect Dis* **19**:1699–1701.
258. **Banerjee R, Johnston B, Lohse C, Porter S, Clabots C, Johnson J.** 2013. *Escherichia coli* sequence type 131 is a dominant, antimicrobial-resistant clonal group associated with healthcare and elderly hosts. *Infect Control Hosp Epidemiol* **34**:361–9.

259. **Chung HC, Lai CH, Lin JN, Huang CK, Liang SH, Chen WF, Shih YC, Lin HH, Wang JL.** 2012. Bacteremia caused by extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* sequence type ST131 and non-ST131 clones: Comparison of demographic data, clinical features, and mortality. *Antimicrob Agents Chemother* **56**:618–622.
260. **Ender PT, Gajanana D, Johnston B, Clabots C, Tamarkin FJ, Johnson JR.** 2009. Transmission of an extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* (Sequence Type ST131) strain between a father and daughter resulting in septic shock and emphysematous pyelonephritis. *J Clin Microbiol* **47**:3780–3782.
261. **Owens RC, Johnson JR, Stogsdill P, Yarmus L, Lolans K, Quinn J.** 2011. Community transmission in the United States of a CTX-M-15-producing Sequence Type ST131 *Escherichia coli* strain resulting in death. *J Clin Microbiol* **49**:3406–3408.
262. **Hilty M, Betsch BY, Bögli-Stuber K, Heiniger N, Stadler M, Küffer M, Kronenberg A, Rohrer C, Aebi S, Endimiani A, Droz S, Mühlemann K.** 2012. Transmission dynamics of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in the tertiary care hospital and the household setting. *Clin Infect Dis* **55**:967–975.
263. **Yamamoto S, Tsukamoto T, Terai A, Kurazono H, Takeda Y, Yoshida O.** 1997. Genetic evidence supporting the fecal-perineal-urethral hypothesis in cystitis caused by *Escherichia coli*. *J Urol* **157**:1127–1129.
264. **Vimont S, Boyd A, Bleibtreu A, Bens M, Goujon JM, Garry L, Clermont O, Denamur E, Arlet G, Vandewalle A.** 2012. The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone O25b: H4-ST131 has high intestine colonization and urinary tract infection abilities. *PLoS One* **7**.
265. **Croxall G, Hale J, Weston V, Manning G, Cheetham P, Achtman M, McNally A.** 2011. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates from a regional cohort of elderly patients highlights the prevalence of ST131 strains with increased antimicrobial resistance in both community and hospital care settings. *J Antimicrob Chemother* **66**:2501–2508.
266. **Totsika M, Beatson SA, Sarkar S, Phan MD, Petty NK, Bachmann N, Szubert M, Sidjabat HE, Paterson DL, Upton M, Schembri MA.** 2011. Insights into a multidrug resistant *Escherichia coli* pathogen of the globally disseminated ST131 lineage: Genome analysis and virulence mechanisms. *PLoS One* **6**.
267. **Gibreel TM, Dodgson AR, Cheesbrough J, Bolton FJ, Fox AJ, Upton M.** 2012. High metabolic potential may contribute to the success of ST131 uropathogenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* **50**:3202–3207.
268. **Hussain A, Ranjan A, Nandanwar N, Babbar A, Jadhav S, Ahmed N.** 2014. Genotypic and phenotypic profiles of *Escherichia coli* isolates belonging to clinical sequence type 131 (ST131), clinical non-ST131, and fecal non-ST131 lineages from India. *Antimicrob Agents Chemother* **58**:7240–9.
269. **Yonezawa H, Osaki T, Kamiya S.** 2015. Biofilm formation by *Helicobacter pylori* and its involvement for antibiotic resistance. *Biomed Res Int* **1**–9.
270. **Hernández-Jiménez E, del Campo R, Toledano V, Vallejo-Cremades MT, Muñoz A, Largo C, Arnalich F, García-Río F, Cubillos-Zapata C, López-Collazo E.** 2013. Biofilm vs. planktonic bacterial mode of growth: Which do human macrophages prefer? *Biochem Biophys Res Commun* **441**:947–952.
271. **Clermont O, Lavollay M, Vimont S, Deschamps C, Forestier C, Branger C, Denamur E, Arlet G.** 2008. The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup. *J Antimicrob Chemother* **61**:1024–1028.
272. **Novais Â, Pires J, Ferreira H, Costa L, Montenegro C, Vuotto C, Donelli G, Coque TM, Peixe L.** 2012. Characterization of globally spread *Escherichia coli* ST131 isolates (1991 to 2010). *Antimicrob Agents Chemother* **56**:3973–3976.
273. **Olesen B, Frimodt-Møller J, Leihof RF, Struve C, Johnston B, Hansen DS, Scheutz F, Krogfelt KA, Kuskowski MA, Clabots C, Johnson JR.** 2014. Temporal trends in antimicrobial resistance and virulence-associated traits within the *Escherichia coli* sequence type 131 clonal group and its H30 and H30-Rx subclones, 1968 to 2012. *Antimicrob Agents Chemother* **58**:6886–95.
274. **Shin J, Ko KS.** 2015. Effect of plasmids harbouring *bla*CTX-M on the virulence and fitness of *Escherichia coli* ST131 isolates. *Int J Antimicrob Agents* **46**:214–218.
275. **Johnson JR, Porter SB, Zhanel G, Kuskowski MA, Denamur E.** 2012. Virulence of *Escherichia coli* clinical isolates in a murine sepsis model in relation to sequence type ST131 status, fluoroquinolone resistance, and virulence genotype. *Infect Immun* **80**:1554–1562.
276. **Lavigne JP, Vergunst AC, Goret L, Sotto A, Combescure C, Blanco J, O’Callaghan D, Nicolas-Chanoine MH.** 2012. Virulence potential and genomic mapping of the worldwide clone *Escherichia coli* ST131. *PLoS One* **7**:1–10.
277. **Alghoribi MF, Gibreel TM, Dodgson AR, Beatson SA, Upton M.** 2014. *Galleria mellonella* infection model demonstrates high lethality of ST69 and ST127 uropathogenic *E. coli*. *PLoS One* **9**.

278. **Jarlier V, Nordmann P.** 2000. Entérobactéries et β -lactamines, p. 649–65. In *Précis de Bactériologie Clinique*, ESKA, Paris.
279. **Golding GR, Persaud N, Levett PN, McDonald RR, Irvine J, Nsungu M, Woods S, Khan M, Mataseje LF, Mulvey MR, Mulvey M, Golding G, Horsman G, Levett PN, McDonald R, Nagle E, Schachtel C, Schwickrath C, Obadiany A, Hansen T, Stockdale D, Irvine J, Quinn B, Mishak-Beckman B, Johnson J, Nsungu M, Woods S, Khan M, Malmgren P, Cholin B, Whitecap Z, Brooke B, McKay M, Bear R, Quinney G, Bear A, Paton S, Ofner-Agostini M, Szclarkuk B, Silcox S, Embil J, Bergstrom K, Horbal A, Siemens C, Persaud N.** 2012. Characterization of *Escherichia coli* urinary tract infection isolates in remote northern Saskatchewan communities: The Northern Antibiotic Resistance Partnership. *Diagn Microbiol Infect Dis* **74**:242–247.
280. **Mathers AJ, Peirano G, Pitout JDD.** 2015. *Escherichia coli* ST131: the quintessential example of an international multiresistant high-risk clone. *Adv Appl Microbiol* **90**:109–154.
281. **Peirano G, Van Der Bij AK, Freeman JL, Poirel L, Nordmann P, Costello M, Tchesnokova VL, Pitout JDD.** 2014. Characteristics of *Escherichia coli* sequence type 131 isolates that produce extended-spectrum β -lactamases: Global distribution of the H30-Rx sublineage. *Antimicrob Agents Chemother* **58**:3762–3767.
282. **D’Andrea M, Arena F, Pallecchi L, Rossolini G.** 2013. CTX-M-type β -lactamases: a successful story of antibiotic resistance. *Int J Med Microbiol* **303**:305–17.
283. **Bonnin RA, Poirel L, Carattoli A, Nordmann P.** 2012. Characterization of an IncFII plasmid encoding NDM-1 from *Escherichia coli* ST131. *PLoS One* **7**:e34752.
284. **Peirano G, Schreckenberger PC, Pitout JDD.** 2011. Characteristics of NDM-1-producing *Escherichia coli* isolates that belong to the successful and virulent clone ST131. *Antimicrob Agents Chemother* **55**:2986–8.
285. **Dimou V, Dhanji H, Pike R, Livermore DM, Woodford N.** 2012. Characterization of *Enterobacteriaceae* producing OXA-48-like carbapenemases in the UK. *J Antimicrob Chemother* **67**:1660–5.
286. **Morris D, McGarry E, Cotter M, Passet V, Lynch M, Ludden C, Hannan MM, Brisse S, Cormican M.** 2012. Detection of OXA-48 carbapenemase in the pandemic clone *Escherichia coli* O25b:H4-ST131 in the course of investigation of an outbreak of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **56**:4030–4031.
287. **Kim YA, Qureshi ZA, Adams-Haduch JM, Park YS, Shutt KA, Doi Y.** 2012. Features of infections due to *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Escherichia coli*: Emergence of sequence type 131. *Clin Infect Dis* **55**:224–231.
288. **Naas T, Cuzon G, Gaillot O, Courcol R, Nordmann P.** 2011. When carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC meets *Escherichia coli* ST131 in France. *Antimicrob Agents Chemother* **55**:4933–4.
289. **Cai JC, Zhang R, Hu YY, Zhou HW, Chen G-X.** 2014. Emergence of *Escherichia coli* sequence type 131 isolates producing KPC-2 carbapenemase in China. *Antimicrob Agents Chemother* **58**:1146–52.
290. **Mantengoli E, Luzzaro F, Pecile P, Cecconi D, Cavallo A, Attala L, Bartoloni A, Rossolini GM.** 2011. *Escherichia coli* ST131 producing extended-spectrum β -lactamases plus VIM-1 carbapenemase: further narrowing of treatment options. *Clin Infect Dis* **52**:690–1.
291. **Yan J, Tsai L, Wu J.** 2012. Emergence of the IMP-8 metallo- β -lactamase in the *Escherichia coli* ST131 clone in Taiwan. *Int J Antimicrob Agents* **40**:281–2.
292. **Peirano G, Bradford P, Kazmierczak K, Badal R, Hackel M, Hoban D, Pitout J.** 2014. Global incidence of carbapenemase-producing *Escherichia coli* ST131. *Emerg Infect Dis* **20**:1928–31.
293. **Cagnacci S, Gualco L, Debbia E, Schito GC, Marchese A.** 2008. European emergence of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* clonal groups O25:H4-ST 131 and O15:H52:H1 causing community-acquired uncomplicated cystitis. *J Clin Microbiol* **46**:2605–2612.
294. **Pitout JDD, Campbell L, Church DL, Wang PW, Guttman DS, Gregson DB.** 2009. Using a commercial DiversiLab semiautomated repetitive sequence-based PCR typing technique for identification of *Escherichia coli* clone ST131 producing CTX-M-15. *J Clin Microbiol* **47**:1212–1215.
295. **Woodford N, Carattoli A, Karisik E, Underwood A, Ellington MJ, Livermore DM.** 2009. Complete nucleotide sequences of plasmids pEK204, pEK499, and pEK516, encoding CTX-M enzymes in three major *Escherichia coli* lineages from the United Kingdom, all belonging to the international O25:H4-ST131 clone. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:4472–82.
296. **Vredenburg J, Varela AR, Hasan B, Bertilsson S, Olsen B, Narciso-da-Rocha C, Bonnedahl J, Stedt J, Da Costa PM, Manaia CM.** 2014. Quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from birds of prey in Portugal are

genetically distinct from those isolated from water environments and gulls in Portugal, Spain and Sweden. *Environ Microbiol* **16**:995–1004.

297. **Nikaido H.** 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**:593–656.
298. **Pagès J.** 2004. Porines bactériennes et sensibilité aux antibiotiques. *M/S Médecine Sci* **20**:346–351.
299. **Albertí S, Rodríguez-Quinones F, Schirmer T, Rummel G, Tomás J, Rosenbusch J, Benedí V.** 1995. A porin from *Klebsiella pneumoniae*: sequence homology, three-dimensional model, and complement binding. *Infect Immun* **63**:903–910.
300. **Hernández-Allés S, Albertí S, Rubirés X, Merino S, Tomás J, Benedí V.** 1996. Isolation of FC3-11, a bacteriophage specific for the *Klebsiella pneumoniae* porin OmpK36, and its use for the isolation of porin-deficient mutants. *Can J Microbiol* **41**:399–406.
301. **Mallea M, Chevalier J, Bornet C, Eyraud A, Davin-Regli A, Bollet C, Pagès JM.** 1998. Porin alteration and active efflux: Two *in vivo* drug resistance strategies used by *Enterobacter aerogenes*. *Microbiology* **144**:3003–3009.
302. **Bornet C, Saint N, Fetnaci L, Dupont M, Davin-Régli A, Bollet C, Pagès JM.** 2004. Omp35, a new *Enterobacter aerogenes* porin involved in selective susceptibility to cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:2153–2158.
303. **Van der Ley P, Bekkers a, Van Meersbergen J, Tommassen J.** 1987. A comparative study on the *phoE* genes of three enterobacterial species. Implications for structure-function relationships in a pore-forming protein of the outer membrane. *Eur J Biochem* **164**:469–475.
304. **Nikaido H, Rosenberg EY.** 1983. Porin channels in *Escherichia coli*: studies with liposomes reconstituted from purified proteins. *J Bacteriol* **153**:241–252.
305. **Nikaido H, Rosenberg EY, Foulds J.** 1983. Porin channels in *Escherichia coli*: studies with β -lactams in intact cells. *J Bacteriol* **153**:232–240.
306. **Ferenci T, Boos W.** 1980. The role of the *Escherichia coli* lambda receptor in the transport of maltose and maltodextrins. *J Supramol Struct* **13**:101–116.
307. **Ferguson A, Hofmann E, Coulton JW, Diederichs K, Welte W.** 1998. Siderophore-mediated iron transport: crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide. *Science* **282**:2215–2220.
308. **Schmid K, Ebner R, Jahreis K, Lengeler J, Titgemeyer F.** 1991. A sugar-specific porin, ScrY, is involved in sucrose uptake in enteric bacteria. *Mol Microbiol* **5**:941–50.
309. **Plumbridge J, Bossi L, Oberto J, Wade JT, Figueroa-Bossi N.** 2014. Interplay of transcriptional and small RNA-dependent control mechanisms regulates chitosugar uptake in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Mol Microbiol* **92**:648–658.
310. **Prilipov A, Phale PS, Koebnik R, Widmer C, Rosenbusch JP.** 1998. Identification and characterization of two quiescent porin genes, *nmpC* and *ompN*, in *Escherichia coli* B(E). *J Bacteriol* **180**:3388–3392.
311. **Doménech-Sánchez A, Hernández-Allés S, Martínez-Martínez L, Benedí V, Albertí S.** 1999. Identification and characterization of a new porin gene of *Klebsiella pneumoniae*: its role in β -lactam antibiotic resistance. *J Bacteriol* **181**:2726–2732.
312. **Fernández-Mora M, Puente JL, Ferna M, Puente L, Calva E.** 2004. OmpR and LeuO positively regulate the *Salmonella enterica* Serovar Typhi *ompS2* porin gene. *J Bacteriol* **186**:2909–2920.
313. **Cowan SW, Schirmer T, Rummel G, Steiert M, Ghosh R, Pauptit RA, Jansonius JN, Rosenbusch JP.** 1992. Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature* **358**:727–733.
314. **Masi M, Pagès JM.** 2013. Structure, function and regulation of outer membrane proteins involved in drug transport in *Enterobacteriaceae*: the OmpF/C - TolC case. *Open Microbiol J* **7**:22–33.
315. **Bredin J, Saint N, Malléa M, Dé E, Molle G, Pagès J-M, Simonet V.** 2002. Alteration of pore properties of *Escherichia coli* OmpF induced by mutation of key residues in anti-loop 3 region. *Biochem J* **363**:521–528.
316. **James CE, Mahendran KR, Molitor A, Bolla JM, Bessonov AN, Winterhalter M, Pagès JM.** 2009. How β -lactam antibiotics enter bacteria: A dialogue with the porins. *PLoS One* **4**:10–13.
317. **Mizuno T, Mizushima S.** 1990. Signal transduction and gene regulation through the phosphorylation of two regulatory components: the molecular basis for the osmotic regulation of the porin genes. *Mol Microbiol* **4**:1077–1082.
318. **Pratt LA, Hsing W, Gibson KE, Silhavy TJ.** 1996. From acids to *osmZ*: Multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **20**:911–917.

319. **Van Alphen W, Lugtenberg B.** 1977. Influence of osmolarity of the growth medium on the outer membrane protein pattern of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **131**:623–630.
320. **Heyde M, Portalier R.** 1987. Regulation of major outer membrane porin proteins of *Escherichia coli* K 12 by pH. *Mol Gen Genet* **208**:511–7.
321. **Villarejo M, Case CC.** 1984. *envZ* mediates transcriptional control by local anesthetics but is not required for osmoregulation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **159**:883–887.
322. **Liu X, Ferenci T.** 1998. Regulation of porin-mediated outer membrane permeability by nutrient limitation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **180**:3917–3922.
323. **Jaffé A, Chabbert Y, Derlot E.** 1983. Selection and characterization of beta-lactam-resistant *Escherichia coli* K-12 mutants. *Antimicrob Agents Chemother* **23**:622–625.
324. **Pogliano J, Lynch A, Belin D, Lin E, Beckwith J.** 1997. Regulation of *Escherichia coli* cell envelope proteins involved in protein folding and degradation by the Cpx two-component system. *Genes Dev* **11**:1169–1182.
325. **Batchelor E, Walthers D, Kenney LJ, Goulian M.** 2005. The *Escherichia coli* CpxA-CpxR envelope stress response system regulates expression of the porins OmpF and OmpC. *J Bacteriol* **187**:5723–5731.
326. **Alba BM, Gross CA.** 2004. Regulation of the *Escherichia coli* sigma-dependent envelope stress response. *Mol Microbiol* **52**:613–619.
327. **Raivio TL, Silhavy TJ.** 2001. Periplasmic stress and ECF sigma factors. *Annu Rev Microbiol* **55**:591–624.
328. **Gerken H, Leiser O, Bennion D, Misra R.** 2010. Involvement and necessity of the Cpx regulon in the event of aberrant β -barrel outer membrane protein assembly. *Mol Microbiol* **75**:1033–46.
329. **Gerken H, Charlson ES, Cicirelli EM, Kenney LJ, Misra R.** 2009. MzrA : a novel modulator of the EnvZ/OmpR two-component regulon. *Mol Microbiol* **72**:1408–22.
330. **Gerken H, Misra R.** 2010. MzrA-EnvZ interactions in the periplasm influence the EnvZ/OmpR two-component regulon. *J Bacteriol* **192**:6271–6278.
331. **Vogel J, Papenfort K.** 2006. Small non-coding RNAs and the bacterial outer membrane. *Curr Opin Microbiol* **9**:605–611.
332. **Guillier M, Gottesman S, Storz G.** 2006. Modulating the outer membrane with small RNAs. *Genes Dev* **20**:2338–2348.
333. **Storz G, Opdyke JA, Zhang A.** 2004. Controlling mRNA stability and translation with small, noncoding RNAs. *Curr Opin Microbiol* **7**:140–144.
334. **Mizuno T, Chou MY, Inouye M.** 1984. A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**:1966–1970.
335. **Chen S, Zhang A, Blyn LB, Storz G.** 2004. MicC , a second small-RNA regulator of OMP protein expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**:6689–6697.
336. **Castillo-Keller M, Vuong P, Misra R.** 2006. Novel mechanism of *Escherichia coli* porin regulation. *J Bacteriol* **188**:576–86.
337. **Bossi L, Figueroa-Bossi N.** 2007. A small RNA downregulates LamB maltoporin in *Salmonella*. *Mol Microbiol* **65**:799–810.
338. **Johansen J, Eriksen M, Kallipolitis B, Valentin-Hansen P.** 2008. Down-regulation of outer membrane proteins by noncoding RNAs: unraveling the cAMP-CRP- and σ E-dependent CyaR-OmpX regulatory case. *J Mol Biol* **383**:1–9.
339. **Barbosa TM, Levy SB.** 2000. Differential expression of over 60 chromosomal genes in *Escherichia coli* by constitutive expression of MarA. *J Bacteriol* **182**:3467–3474.
340. **Dupont M, James CE, Chevalier J, Pagès JM.** 2007. An early response to environmental stress involves regulation of OmpX and OmpF, two enterobacterial outer membrane pore-forming proteins. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:3190–3198.
341. **Viveiros M, Dupont M, Rodrigues L, Couto I, Davin-Regli A, Martins M, Pagès JM, Amaral L.** 2007. Antibiotic stress, genetic response and altered permeability of *E. coli*. *PLoS One* **2**.
342. **Davin-Regli A, Bolla J, James C, Lavigne J, Chevalier J, Garnotel E, Molitor A, Pagès J.** 2008. Membrane permeability and regulation of drug “influx and efflux” in enterobacterial pathogens. *Curr Drug Targets* **9**:750–9.
343. **George AM, Levy SB.** 1983. Gene in the major cotransduction gap of the *Escherichia coli* K-12 linkage map required for the expression of chromosomal resistance to tetracycline and other antibiotics. *J Bacteriol* **155**:541–548.

344. **Alekshun MN, Levy SB.** 1997. Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: The *mar* regulon. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:2067–2075.
345. **Vinué L, McMurphy L, Levy S.** 2013. The 216 bp *marB* gene of the *marRAB* operon in *Escherichia coli* encodes a periplasmic protein which reduces the transcription rate of *marA*. *FEMS Microbiol Lett* **345**:49–55.
346. **Martin RG, Jair KW, Wolf RE, Rosner JL.** 1996. Autoactivation of the *marRAB* multiple antibiotic resistance operon by the MarA transcriptional activator in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**:2216–2223.
347. **Griffith KL, Shah IM, Wolf RE.** 2004. Proteolytic degradation of *Escherichia coli* transcription activators SoxS and MarA as the mechanism for reversing the induction of the superoxide (SoxRS) and multiple antibiotic resistance (Mar) regulons. *Mol Microbiol* **51**:1801–1816.
348. **Wu J, Weiss B.** 1992. Two-stage induction of the *soxRS* (superoxide response) regulon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **174**:3915–3920.
349. **Tsaneva IR, Weiss B.** 1990. *soxR*, a locus governing a superoxide response regulon in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **172**:4197–4205.
350. **Wu JIE, Weiss B.** 1991. Two divergently transcribed genes, *soxR* and *soxS*, control a superoxide response regulon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **173**:2864–2871.
351. **Wu J, Dunham WR, Weiss B.** 1995. Overproduction and physical characterization of SoxR, a [2Fe-2S] protein that governs an oxidative response regulon in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*.
352. **Martin RG, Gillette WK, Rhee S, Rosner JL.** 1999. Structural requirements for marbox function in transcriptional activation of *mar/sox/rob* regulon promoters in *Escherichia coli*: Sequence, orientation and spatial relationship to the core promoter. *Mol Microbiol* **34**:431–441.
353. **Skarstad K, Thony B, Hwang DS, Kornberg A.** 1993. A novel binding protein of the origin of the *Escherichia coli* chromosome. *J Biol Chem* **268**:5365–5370.
354. **Jair KW, Yu X, Skarstad K, Thöny B, Fujita N, Ishihama A, Wolf RE.** 1996. Transcriptional activation of promoters of the superoxide and multiple antibiotic resistance regulons by Rob, a binding protein of the *Escherichia coli* origin of chromosomal replication. *J Bacteriol* **178**:2507–2513.
355. **Rosenberg EY, Bertenthal D, Nilles ML, Bertrand KP, Nikaido H.** 2003. Bile salts and fatty acids induce the expression of *Escherichia coli* AcrAB multidrug efflux pump through their interaction with Rob regulatory protein. *Mol Microbiol* **48**:1609–1619.
356. **Robert J, Pantel A, Mérens A, Lavigne J-P, Nicolas-Chanoine M-H.** 2014. Incidence rates of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* clinical isolates in France: a prospective nationwide study in 2011-12. *J Antimicrob Chemother* **69**:2706–2712.
357. **Pantel A, Boutet-Dubois A, Jean-Pierre H, Marchandin H, Sotto A, Lavigne JP.** 2014. French regional surveillance program of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli: results from a 2-year period. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **33**:2285–92.
358. **Hasdemir UO, Chevalier J, Nordmann P, Pagès JM.** 2004. Detection and prevalence of active drug efflux mechanism in various multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from Turkey. *J Clin Microbiol* **42**:2701–2706.
359. **Hernández-Allés S, Albertí S, Alvarez D, Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Gil J, Tomás JM, Benedí VJ.** 1999. Porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology* **145** (Pt 3):673–679.
360. **Oteo J, Delgado-Iribarren A, Vega D, Bautista V, Rodríguez MC, Velasco M, Saavedra JM, Pérez-Vázquez M, García-Cobos S, Martínez-Martínez L, Campos J.** 2008. Emergence of imipenem resistance in clinical *Escherichia coli* during therapy. *Int J Antimicrob Agents* **32**:534–537.
361. **Lavigne JP, Sotto A, Nicolas-Chanoine MH, Bouziges N, Pagès JM, Davin-Regli A.** 2013. An adaptive response of *Enterobacter aerogenes* to imipenem: Regulation of porin balance in clinical isolates. *Int J Antimicrob Agents* **41**:130–136.
362. **Lartigue MF, Poirel L, Poyart C, Réglie-Poupet H, Nordmann P.** 2007. Ertapenem resistance of *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* **13**:315–317.
363. **Doumith M, Ellington MJ, Livermore DM, Woodford N.** 2009. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. *J Antimicrob Chemother* **63**:659–667.

364. **Mena A, Plasencia V, García L, Hidalgo O, Ayestarán JI, Alberti S, Borrell N, Pérez JL, Oliver A.** 2006. Characterization of a large outbreak by CTX-M-1-producing *Klebsiella pneumoniae* and mechanisms leading to in vivo carbapenem resistance development. *J Clin Microbiol* **44**:2831–2837.
365. **Hernández-Allés S, Conejo MD, Pascual A, Tomás JM, Benedí VJ, Martínez-Martínez L.** 2000. Relationship between outer membrane alterations and susceptibility to antimicrobial agents in isogenic strains of *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* **46**:273–277.
366. **Jacoby GA, Mills DM, Chow N.** 2004. Role of β -lactamases and porins in resistance to ertapenem and other β -lactams in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:3203–3206.
367. **Martínez-Martínez L, Pascual A, Hernández-Allés S, Alvarez-Díaz D, Suárez AI, Tran J, Benedí VJ, Jacoby GA.** 1999. Roles of β -lactamases and porins in activities of carbapenems and cephalosporins against *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **43**:1669–1673.
368. **Wozniak A, Villagra NA, Undabarrena A, Gallardo N, Keller N, Moraga M, Román JC, Mora GC, García P.** 2012. Porin alterations present in non-carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* with high and intermediate levels of carbapenem resistance in Chile. *J Med Microbiol* **61**:1270–1279.
369. **Gülmez D, Woodford N, Palepou MFI, Mushtaq S, Metan G, Yakupogullari Y, Kocagoz S, Uzun O, Hascelik G, Livermore DM.** 2008. Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Turkey with OXA-48-like carbapenemases and outer membrane protein loss. *Int J Antimicrob Agents* **31**:523–526.
370. **Low AS, MacKenzie FM, Gould IM, Booth IR.** 2001. Protected environments allow parallel evolution of a bacterial pathogen in a patient subjected to long-term antibiotic therapy. *Mol Microbiol* **42**:619–630.
371. **Baslé A, Rummel G, Storici P, Rosenbusch JP, Schirmer T.** 2006. Crystal Structure of Osmoporin OmpC from *E. coli* at 2.0 Å. *J Mol Biol* **362**:933–942.
372. **Dé E, Baslé A, Jaquinod M, Saint N, Malléa M, Molle G, Pagès JM.** 2001. A new mechanism of antibiotic resistance in *Enterobacteriaceae* induced by a structural modification of the major porin. *Mol Microbiol* **41**:189–198.
373. **García-Fernández A, Miriagou V, Papagiannitsis CC, Giordano A, Venditti M, Mancini C, Carattoli A.** 2010. An ertapenem-resistant extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* clone carries a novel OmpK36 porin variant. *Antimicrob Agents Chemother* **54**:4178–84.
374. **Novais Â, Rodrigues C, Branquinho R, Antunes P, Grosso F, Boaventura L, Ribeiro G, Peixe L.** 2012. Spread of an OmpK36-modified ST15 *Klebsiella pneumoniae* variant during an outbreak involving multiple carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* species and clones. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **31**:3057–3063.
375. **Dela Vega A, Delcour AH.** 1996. Polyamines decrease *Escherichia coli* outer membrane permeability. *J Bacteriol* **178**:3715–3721.
376. **Samartzidou H, Mehrazin M, Xu Z, Benedik MJ, Delcour AH.** 2003. Cadaverine inhibition of porin plays a role in cell survival at acidic pH. *J Bacteriol* **185**:13–19.
377. **Ferenci T.** 2005. Maintaining a healthy SPANC balance through regulatory and mutational adaptation. *Mol Microbiol* **57**:1–8.
378. **Rolhion N, Carvalho FA, Darfeuille-Michaud A.** 2007. OmpC and the σ E regulatory pathway are involved in adhesion and invasion of the Crohn's disease-associated *Escherichia coli* strain LF82. *Mol Microbiol* **63**:1684–1700.
379. **Turner AK, Terry TD, Sack DA, Londoño-Arcila P, Darsley MJ.** 2001. Construction and characterization of genetically defined *aro omp* mutants of enterotoxigenic *Escherichia coli* and preliminary studies of safety and immunogenicity in humans. *Infect Immun* **69**:4969–4979.
380. **Tsai YK, Fung CP, Lin JC, Chen JH, Chang FY, Chen TL, Siu LK.** 2011. *Klebsiella pneumoniae* outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 play roles in both antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob Agents Chemother* **55**:1485–1493.
381. **Markham PN, Neyfakh AA.** 2001. Efflux-mediated drug resistance in Gram-positive bacteria. *Curr Opin Microbiol* **4**:509–514.
382. **Poole K.** 2004. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* **10**:12–26.
383. **Hobbs EC, Yin X, Paul BJ, Astarita JL, Storz G.** 2012. Conserved small protein associates with the multidrug efflux pump AcrB and differentially affects antibiotic resistance. *Proc Natl Acad Sci* **109**:16696–16701.
384. **Eswaran J, Koronakis E, Higgins MK, Hughes C, Koronakis V.** 2004. Three's company: Component structures bring a closer view of tripartite drug efflux pumps. *Curr Opin Struct Biol* **14**:741–747.
385. **Du D, Wang Z, James NR, Voss JE, Klimont E, Ohene-Agyei T, Venter H, Chiu W, Luisi BF.** 2015. Structure of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump. *Nature* **509**:512–515.

386. **Murakami S, Nakashima R, Yamashita E, Yamaguchi A.** 2002. Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* **419**:587–593.
387. **Koronakis V, Sharff A, Koronakis E, Luisi B, Hughes C.** 2000. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* **405**:914–919.
388. **Higgins MK, Bokma E, Koronakis E, Hughes C, Koronakis V.** 2004. Structure of the periplasmic component of a bacterial drug efflux pump. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:9994–9999.
389. **Thanassi DG, Cheng LW, Nikaido H.** 1997. Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**:2512–2518.
390. **Piddock LJ V.** 2006. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nat Rev Microbiol* **4**:629–636.
391. **Mazzariol A, Cornaglia G, Nikaido H.** 2000. Contributions of the AmpC beta-lactamase and the AcrAB multidrug efflux system in intrinsic resistance of *Escherichia coli* K-12 to beta-lactams. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:1387–1390.
392. **Nikaido H, Basina M, Nguyen V, Emiko Y, Rosenberg EY.** 1998. Multidrug efflux pump AcrAB of *Salmonella typhimurium* excretes only those β -lactam antibiotics containing lipophilic side chains. *J Bacteriol* **180**:4686–4692.
393. **Ma D, Alberti M, Lynch C, Nikaido H, Hearst JE.** 1996. The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of *acrAB* genes of *Escherichia coli* by global stress signals. *Mol Microbiol* **19**:101–112.
394. **White DG, Goldman JD, Demple B, Levy SB.** 1997. Role of the *acrAB* locus in organic solvent tolerance mediated by expression of *marA*, *soxS*, or *robA* in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**:6122–6126.
395. **Hirakawa H, Takumi-Kobayashi A, Theisen U, Hirata T, Nishino K, Yamaguchi A.** 2008. AcrS/EnvR represses expression of the *acrAB* multidrug efflux genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **190**:6276–6279.
396. **Rahmati S, Yang S, Davidson AL, Zechiedrich EL.** 2002. Control of the AcrAB multidrug efflux pump by quorum sensing regulator SdiA. *Mol Microbiol* **43**:677–685.
397. **Nishino K, Yamaguchi A.** 2004. Role of histone-like protein H-NS in multidrug resistance of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**:1423–1429.
398. **Zhang A, Rosner JL, Martin RG.** 2008. Transcriptional activation by MarA, SoxS and Rob of two *tolC* promoters using one binding site: a complex promoter configuration for *tolC* in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **69**:1450–1455.
399. **Chollet R, Chevalier J, Bryskier A, Pagès JM.** 2004. The AcrAB-TolC pump is involved in macrolide resistance but not in telithromycin efflux in *Enterobacter aerogenes* and *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:3621–3624.
400. **Olliver A, Vallé M, Chaslus-Dancla E, Cloeckaert A.** 2004. Role of an *acrR* mutation in multidrug resistance of *in vitro*-selected fluoroquinolone-resistant mutants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *FEMS Microbiol Lett* **238**:267–272.
401. **Pradel E, Pagès JM.** 2002. The AcrAB-TolC efflux pump contributes to multidrug resistance in the nosocomial pathogen *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:2640–2643.
402. **Schneiders T, Amyes SGB, Levy SB.** 2003. Role of AcrR and RamA in fluoroquinolone resistance in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Singapore. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:2831–2837.
403. **Ren Y, Li J, Zhang X, Zeng Z, Zhen P, Zeng D, Liu Y, Jiang H.** 2012. Contribution of insertion within *acrR* to *acrAB* expression and ciprofloxacin resistance in a veterinary *Escherichia coli* isolate. *J Anim Vet Adv* **11**:2436–9.
404. **Sato T, Yokota SI, Uchida I, Okubo T, Usui M, Kusumoto M, Akiba M, Fujii N, Tamura Y.** 2013. Fluoroquinolone resistance mechanisms in an *Escherichia coli* isolate, HUE1, without quinolone resistance-determining region mutations. *Front Microbiol* **4**:1–12.
405. **Webber MA, Talukder A, Piddock LJ V.** 2005. Contribution of mutation at amino acid 45 of AcrR to *acrB* expression and ciprofloxacin resistance in clinical and veterinary *Escherichia coli* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:4390–4392.
406. **Komp Lindgren P, Karlsson A, Hughes D.** 2003. Mutation rate and evolution of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:3222–3232.
407. **Wang H, Dzink-Fox J, Chen M, Levy SB.** 2001. Genetic characterization of highly fluoroquinolone-resistant clinical *Escherichia coli* strains from China: role of *acrR* mutations. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:1515–1521.
408. **Koutsolioutsou A, Peña-Llopis S, Demple B.** 2005. Constitutive *soxR* mutations contribute to multiple-antibiotic resistance in clinical *Escherichia coli* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:2746–2752.

409. **Maneewannakul K, Levy SB.** 1996. Identification for *mar* mutants among quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **40**:1695–8.
410. **Notka F, Linde H-J, Dankesreiter A, Niller H-H, Lehn N.** 2002. A C-terminal 18 amino acid deletion in MarR in a clinical isolate of *Escherichia coli* reduces MarR binding properties and increases the MIC of ciprofloxacin. *J Antimicrob Chemother* **49**:41–47.
411. **Tavio MM, Aquili VD, Poveda JB, Antunes NT, Sánchez-Céspedes J, Vila J.** 2010. Quorum-sensing regulator *sdiA* and *marA* overexpression is involved in *in vitro*-selected multidrug resistance of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* **65**:1178–1186.
412. **Abouzeed YM, Baucheron S, Cloeckaert A.** 2008. *ramR* mutations involved in efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:2428–2434.
413. **Bialek-Davenet S, Marcon E, Leflon-Guibout V, Lavigne JP, Bert F, Moreau R, Nicolas-Chanoine MH.** 2011. *In vitro* selection of *ramR* and *soxR* mutants overexpressing efflux systems by fluoroquinolones as well as cefoxitin in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **55**:2795–2802.
414. **Olliver A, Vallé M, Chaslus-Dancla E, Cloeckaert A.** 2005. Overexpression of the multidrug efflux operon *acrEF* by insertional activation with *IS1* or *IS10* elements in *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT204 *acrB* mutants selected with fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:289–301.
415. **Kobayashi K, Tsukagoshi N, Aono R.** 2001. Suppression of hypersensitivity of *Escherichia coli* *acrB* mutant to organic solvents by integrational activation of the *acrEF* operon with the *IS1* or *IS2* element. *J Bacteriol* **183**:2646–53.
416. **Jellen-Ritter AS, Kern W V.** 2001. Enhanced expression of the multidrug efflux pumps AcrAB and AcrEF associated with insertion element transposition in *Escherichia coli* mutants selected with a fluoroquinolone. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:1467–1472.
417. **Mazzariol A, Tokue Y, Kanegawa TM, Cornaglia G, Nikaido H.** 2000. High-level fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* overproduce multidrug efflux protein AcrA. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:3441–3443.
418. **Ruzin A, Visalli MA, Keeney D, Bradford PA.** 2005. Influence of transcriptional activator RamA on expression of multidrug efflux pump AcrAB and tigecycline susceptibility in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:1017–22.
419. **Ma D, Cook DN, Alberti M, Pon NG, Nikaido H, Hearst JE.** 1993. Molecular cloning and characterization of *acrA* and *acrE* genes of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**:6299–313.
420. **Rosenberg EY, Ma D, Nikaido H.** 2000. AcrD of *Escherichia coli* is an aminoglycoside efflux pump. *J Bacteriol* **182**:1754–1756.
421. **Koronakis V, Eswaran J, Hughes C.** 2004. Structure and function of TolC: the bacterial exit duct for proteins and drugs. *Annu Rev Biochem* **73**:467–489.
422. **Hirata T, Saito A, Nishino K, Tamura N, Yamaguchi A.** 2004. Effects of efflux transporter genes on susceptibility of *Escherichia coli* to tigecycline (GAR-936). *Antimicrob Agents Chemother* **48**:2179–2184.
423. **Horiyama T, Nikaido E, Yamaguchi A, Nishino K.** 2011. Roles of *Salmonella* multidrug efflux pumps in tigecycline resistance. *J Antimicrob Chemother* **66**:105–110.
424. **Aires JR, Nikaido H.** 2005. Aminoglycosides are captured from both periplasm and cytoplasm by the AcrD multidrug efflux transporter of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**:1923–1929.
425. **Lennen RM, Politz MG, Kruziki MA, Pfleger BF.** 2013. Identification of transport proteins involved in free fatty acid efflux in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **195**:135–144.
426. **Zhang Y, Xiao M, Horiyama T, Zhang Y, Li X, Nishino K, Yan A.** 2011. The multidrug efflux pump MdtEF protects against nitrosative damage during the anaerobic respiration in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **286**:26576–84.
427. **Baranova N, Nikaido H.** 2002. The BaeSR two-component regulatory system activates transcription of the *yegMNOB* (*mdtABCD*) transporter gene cluster in *Escherichia coli* and increases its resistance to novobiocin and deoxycholate. *J Bacteriol* **184**:4168–4176.
428. **Li X-Z, Nikaido H.** 2004. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs* **64**:159–204.
429. **Lomovskaya O, Warren MS, Lee A, Galazzo J, Fronko R, Lee M, Blais J, Cho D, Chamberland S, Renau T, Leger R, Hecker S, Watkins W, Hoshino K, Ishida H, Lee VJ.** 2001. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:105–116.

430. **Pagès J, Amaral L.** 2009. Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1794**:826–33.
431. **Lacroix FJC, Cloeckaert A, Grépinet O, Pinault C, Popoff MY, Waxin H, Pardon P.** 1996. *Salmonella* Typhimurium *acrB*-like gene: Identification and role in resistance to biliary salts and detergents and in murine infection. *FEMS Microbiol Lett* **135**:161–167.
432. **Baucheron S, Mouline C, Praud K, Chaslus-Dancla E, Cloeckaert A.** 2005. TolC but not AcrB is essential for multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium colonization of chicks. *J Antimicrob Chemother* **55**:707–712.
433. **Blair JM, La Ragione RM, Woodward MJ, Piddock LJ V.** 2009. Periplasmic adaptor protein AcrA has a distinct role in the antibiotic resistance and virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Antimicrob Chemother* **64**:965–972.
434. **Jerse AE, Sharma ND, Simms AN, Crow ET, Snyder LA, Shafer WM.** 2003. A gonococcal efflux pump system enhances bacterial survival in a female mouse model of genital tract infection. *Infect Immun* **71**:5576–82.
435. **Hirakata Y, Srikumar R, Poole K, Gotoh N, Suematsu T, Kohno S, Kamihira S, Hancock REW, Speert DP.** 2002. Multidrug efflux systems play an important role in the invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Exp Med* **196**:109–118.
436. **Bialek-Davenet S, Lavigne J-P, Guyot K, Mayer N, Tournebize R, Brisse S, Leflon-Guibout V, Nicolas-Chanoine M-H.** 2015. Differential contribution of AcrAB and OqxAB efflux pumps to multidrug resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* **70**:81–88.
437. **Padilla E, Llobet E, Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Bengoechea JA, Albertí S.** 2010. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob Agents Chemother* **54**:177–183.
438. **Yamanaka H, Kobayashi H, Takahashi E, Okamoto K.** 2008. MacAB is involved in the secretion of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *J Bacteriol* **190**:7693–7698.
439. **Baugh S, Ekanayaka AS, Piddock LJ V, Webber MA.** 2012. Loss of or inhibition of all multidrug resistance efflux pumps of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium results in impaired ability to form a biofilm. *J Antimicrob Chemother* **67**:2409–2417.
440. **Matsumura K, Furukawa S, Ogihara H, Morinaga Y.** 2011. Roles of multidrug efflux pumps on the biofilm formation of *Escherichia coli* K-12. *Biocontrol Sci* **16**:69–72.
441. **Lin YT, Huang YW, Liou RS, Chang YC, Yang TC.** 2014. MacABCsm, an ABC-type tripartite efflux pump of *Stenotrophomonas maltophilia* involved in drug resistance, oxidative and envelope stress tolerances and biofilm formation. *J Antimicrob Chemother* **69**:3221–3226.
442. **Réseau d'alerte d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales (Raisin).** Surveillance des bactéries multi résistantes dans les établissements de santé en France, Réseau BMR-Raisin, Résultats 2012. Disponible à l'adresse : <http://www.invs.sante.fr/bmr-raisin>.
443. **Swick MC, Morgan-Linnell SK, Carlson KM, Zechiedrich L.** 2011. Expression of multidrug efflux pump genes *acrAB-tolC*, *mdfA*, and *norE* in *Escherichia coli* clinical isolates as a function of fluoroquinolone and multidrug resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **55**:921–924.
444. **Potron A, Poirel L, Nordmann P.** 2011. Plasmid-mediated transfer of the *bla*(NDM-1) gene in Gram-negative rods. *FEMS Microbiol Lett* **324**:111–6.
445. **Poirel L, Potron A, Nordmann P.** 2012. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother* **67**:1597–606.
446. **Cuzon G, Bentchouala C, Vogel A, Héry M, Lezzar A, Smati F, Dortet L, Naas T.** 2015. First outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Constantine, Algeria. *Int J Antimicrob Agents pii*: S0924–8579(15)00296–4.
447. **Agabou A, Pantel A, Ouchenane Z, Lezzar N, Khemissi S, Satta D, Sotto A, Lavigne JP.** 2014. First description of OXA-48-producing *Escherichia coli* and the pandemic clone ST131 from patients hospitalised at a military hospital in Algeria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **33**:1641–6.
448. **Yumuk Z, Afacan G, Nicolas-Chanoine MH, Sotto A, Lavigne JP.** 2008. Turkey: a further country concerned by community-acquired *Escherichia coli* clone O25-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother* **62**:284–288.
449. **Pages JM, Lavigne JP, Leflon-Guibout V, Marcon E, Bert F, Noussair L, Nicolas-Chanoine MH.** 2009. Efflux pump, the masked side of β -lactam resistance in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *PLoS One* **4**.

450. **Girlich D, Poirel L, Nordmann P.** 2009. CTX-M expression and selection of ertapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:832–834.
451. **Piddock LJ, White DG, Gensberg K, Pumbwe L, Griggs DJ.** 2000. Evidence for an efflux pump mediating multiple antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:3118–3121.
452. **Lavigne JP, Marchandin H, Delmas J, Moreau J, Bouziges N, Lecaillon E, Cavalie L, Jean-Pierre H, Bonnet R, Sotto A.** 2007. CTX-M β -lactamase-producing *Escherichia coli* in French hospitals: Prevalence, molecular epidemiology, and risk factors. *J Clin Microbiol* **45**:620–626.
453. **Brzuszkiewicz E, Brüggemann H, Liesegang H, Emmerth M, Olschläger T, Nagy G, Albermann K, Wagner C, Buchrieser C, Emody L, Gottschalk G, Hacker J, Dobrindt U.** 2006. How to become a uropathogen: comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:12879–12884.
454. **Baquero F, Negri M-C, Morosoni M, Blázquez J.** 1998. Antibiotic-selective environments. *Clin Infect Dis* **27**:S5–11.
455. **Andersson DI, Hughes D.** 2014. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat Rev Microbiol* **12**:465–78.
456. **Tangden T, Adler M, Cars O, Sandegren L, Lowdin E.** 2013. Frequent emergence of porin-deficient subpopulations with reduced carbapenem susceptibility in ESBL-producing *Escherichia coli* during exposure to ertapenem in an *in vitro* pharmacokinetic model. *J Antimicrob Chemother* **68**:1319–1326.
457. **Girlich D, Poirel L, Nordmann P.** 2008. Do CTX-M β -lactamases hydrolyse ertapenem? *J Antimicrob Chemother* **62**:1155–1156.
458. **Lane MC, Alteri CJ, Smith SN, Mobley HLT.** 2007. Expression of flagella is coincident with uropathogenic *Escherichia coli* ascension to the upper urinary tract. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:16669–16674.
459. **Linares JF, Gustafsson I, Baquero F, Martinez JL.** 2006. Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:19484–19489.
460. **Wood TK, González Barrios AF, Herzberg M, Lee J.** 2006. Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* **72**:361–367.
461. **Chang K-C, Kuo H-Y, Tang CY, Chang C-W, Lu C-W, Liu C-C, Lin H-R, Chen K-H, Liou M-L.** 2014. Transcriptome profiling in imipenem-selected *Acinetobacter baumannii*. *BMC Genomics* **15**:815.
462. **O’Callaghan D, Vergunst A.** 2010. Non-mammalian animal models to study infectious disease: worms or fly fishing? *Curr Opin Microbiol* **13**:79–85.
463. **Vergunst AC, Meijer AH, Renshaw SA, O’Callaghan D.** 2010. *Burkholderia cenocepacia* creates an intramacrophage replication niche in zebrafish embryos, followed by bacterial dissemination and establishment of systemic infection. *Infect Immun* **78**:1495–508.